

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zu spezifischen hippokampalen  
Läsionsmustern bei epileptischen Katzen

von Eva Katharina Wagner

aus Oberndorf am Neckar

München 2015

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Tierpathologie

Abteilung für klinische und vergleichende Neuropathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg  
Prof. Dr. Andrea Fischer  
Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz  
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korb

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

**Meinen Eltern**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Allgemeines zu Epilepsie .....</b>	<b>3</b>
1.1.	Definition und Vorkommen.....	3
1.2.	Einteilung und Nomenklatur epileptischer Anfälle .....	4
1.2.1.	Einteilung nach Anfallsursprung.....	4
1.2.2.	Einteilung nach Anfallsätiologie .....	4
1.3.	Die Rolle des Hippocampus für die Epilepsie .....	5
1.3.1.	Anatomie und Histologie .....	5
1.3.2.	Afferenzen und Efferenzen .....	6
<b>2.</b>	<b>Hippokampussklerose beim Menschen .....</b>	<b>10</b>
2.1.	Definition .....	10
2.2.	Historisches .....	11
2.3.	Ätiologie .....	12
2.4.	HS und Demenz.....	14
2.5.	Mit HS assoziierte Körnerzellpathologie.....	14
2.6.	Grading-Systeme für humane HS .....	16
2.6.1.	Nach Wyler et al. (1992) .....	16
2.6.2.	Nach Watson et al. (1996) .....	17
2.6.3.	Nach Proper et al. (2001).....	18
2.6.4.	Nach Blümcke et al. ....	19
2.6.4.1.	Kliniko-pathologisches Klassifizierungssystem für mesiale Temporallappensklerose (2007).....	19
2.6.4.2.	Konsensus-Protokoll der ILAE zur Einteilung der HS (2013) .....	21
2.6.4.3.	Kliniko-pathologisches Einteilungsschema der Körnerzelldispersion (2009).....	22
<b>3.</b>	<b>Tiermodelle für Epilepsie .....</b>	<b>23</b>
3.1.	Kindling-Modelle.....	26
3.1.1.	Kindling-Modelle an Labornagern .....	26
3.1.2.	Kindling-Modelle an Hund und Katze .....	27
3.2.	Modelle mit selbst-erhaltendem Status epilepticus .....	28
3.2.1.	SSSE durch Pilokarpin.....	29

3.2.2.	SSSE durch Kainsäure .....	30
3.2.2.1.	SSSE durch Kainsäure bei Labornagern .....	30
3.2.2.2.	SSSE durch Kainsäure bei Hund und Katze .....	31
3.2.3.	SSSE durch elektrische Stimulation.....	32
<b>4.</b>	<b>Klinische Studien zur Epilepsie bei Katzen .....</b>	<b>33</b>
4.1.	Demographische Daten .....	33
4.2.	Limbische Enzephalitis und Hippokampusnekrose .....	34
<b>III.</b>	<b>TEILSTUDIE 1 .....</b>	<b>39</b>
<b>IV.</b>	<b>TEILSTUDIE 2 .....</b>	<b>77</b>
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>103</b>
1.	Bisherige Erkenntnisse zu felineer Hippokampuspathologie ..	103
2.	Anwendbarkeit humaner Grading-Systeme bei felineen Epilepsiepatienten .....	105
3.	Auswahl des Patientenguts und Aufarbeitung des zu untersuchenden Gewebes .....	108
3.1.	Feline Epilepsiepatienten – Vor- und Nachteile gegenüber humanmedizinischen Studien .....	108
3.2.	Auswahl geeigneter Untersuchungsalgorithmen .....	109
4.	Segmentale Ähnlichkeiten und Unterschiede der humanen und felineen HS .....	111
5.	Vorschlag eines Grading-Systems für feline HS .....	114
6.	Überlegungen zu akuten und chronischen Epilepsiemodellen ... .....	117
7.	Vorschläge für die weitere Untersuchung von fHS.....	120
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>122</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>124</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>126</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>150</b>
1.	Methoden .....	150

1.1.	Herstellung der Paraffinschnitte .....	150
1.2.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) .....	150
1.3.	Protokoll für Immunhistochemie .....	151
<b>2.</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>153</b>
2.1.	Verwendete Chemikalien .....	153
2.2.	Verwendete Lösungen: .....	154
2.3.	Verwendete Geräte .....	155
2.4.	Verwendete Software .....	156
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>157</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
CA	Cornu ammonis
DAB	3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DG	Dentate gyrus / Gyrus dentatus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EUC	Epilepsy of unknown cause / Epilepsie unbekannter Ursache
fHS	feline Hippokampussklerose
FJC	Fluoro-Jade-C
g	Gramm
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GCD	Granule-cell-dispersion / Körnerzelldispersion
GCL	Granule-cell layer / Körnerzellschicht
GCP	Granule cell pathology / Körnerzellpathologie
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HN	Hippokampusnekrose
HS	Hippokampussklerose
ILAE	International League Against Epilepsy
INND	Interneurononukleäre Distanz
IPI	Initial precipitating injury / Initiales präzipitierendes Ereignis
KA	Kainsäure
KMnO <sub>4</sub>	Kaliumpermanganat
l	Liter
LE	Limbischer Enzephalitis



LEHN	Limbische-Enzephalitis-Hippokampusnekrose-Komplex
MFS	Mossy fibre sprouting / Moosfasersprossung
min	Minute
ML	Molecular layer / Molekularschicht
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomograph
MTD	Mesial temporal damage
MTS	Mesial temporal sclerosis / Mesiale temporale Sklerose
PBS	Phosphate-buffered saline
REM	Rapid-eye-movement
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDx2	zweifache Standardabweichung
SDx4	vierfache Standardabweichung
SDx6	sechsfache Standardabweichung
SE	Status epilepticus
SGZ	Subgranularzone
SRS	Spontaneous recurring seizures / spontan rezidivierende Anfälle
SSSE	Self-sustaining Status epilepticus / selbsterhaltender Status epilepticus
TES	3-Aminopropyltriethoxy-Silan
TLE	Temporallappenepilepsie
Tr.	Tropfen
VGKC	Voltage-gated Kalium Channel
WHO	World Health Organization



## **I. EINLEITUNG**

Epilepsie ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen beim Menschen, ebenso wie bei unseren Haustieren. Weltweit sind um die 50 Millionen Menschen an Epilepsie erkrankt (ANONYMOUS, 2014a). Die der Epilepsie unterliegenden Ursachen und ihre klinischen und pathologischen Ausprägungen können sehr vielfältig sein.

Ein Zusammenhang zwischen epileptischen Anfällen und Hippokampussklerose (HS) wurde bereits vor fast 200 Jahren gezogen, als Bouchet und Kollegen den Hippokampus epileptischer Patienten erstmals als aufgehellte, verkleinert und verhärtet beschreiben (BOUCHET, 1825). Seitdem wurden das Auftreten und die Auswirkungen von HS oft und eingehend untersucht (THOM, 2009).

Unter HS versteht man Neuronenverlust im Pyramidenzellband, der von reaktiver Astroglieose begleitet wird. Außerdem treten häufig auch Körnerzellpathologien (GCP) wie Körnerzellnekrosen oder Körnerzelldispersion (GCD) auf (HOUSER, 1990; BLUMCKE et al., 2002; WIESER, 2004).

Beim Menschen ist die Temporallappenepilepsie (TLE) mit etwa 10% eine recht häufig auftretende Epilepsieform (TELLEZ-ZENTENO & HERNANDEZ-RONQUILLO, 2012). Sie geht mit typischen fokalen Anfällen einher, die sich hauptsächlich als Kontraktionen der Gesichts- und Kaumuskulatur manifestieren (FRENCH et al., 1993; SPENCER, 2002). Die Assoziation von TLE mit HS wird als einer der Schlüsselfaktoren für die bei dieser Epilepsieform häufig auftretende Pharmakoresistenz betrachtet (BLUMCKE et al., 2002). Untermuert wird dies durch die Tatsache, dass 80% der Patienten, die unter HS litten, nach einer chirurgischen Entfernung der veränderten Areale, von Anfallsfreiheit über mindestens die folgenden zwölf Monate profitieren (BLUMCKE et al., 2007). Über die Entstehung und die Frage, ob HS ein Auslöser oder eine Folge der Krampfanfälle ist, lässt sich trotz der bisher gewonnenen Fülle an Erkenntnissen zum heutigen Zeitpunkt nur spekulieren (JEFFERYS, 1999).

Bei epileptischen Katzen wurde in den letzten Jahren vermehrt von limbischen Anfällen mit orofazialen Symptomen berichtet (FATZER et al., 2000; PAKOZDY et al., 2010; PAKOZDY et al., 2011). Durch frühere Arbeiten, die die Katze als Modelltier für die Epilepsieforschung verwendeten, war bereits bekannt, dass diese Art von Anfällen ihren Ursprung im Temporallappen haben (GASTAUT et al., 1959a; WADA et al., 1986a). Zudem wurden in letzter Zeit einzelne Fälle publiziert, bei denen die Hippocampi von Katzen mit orofazialen Anfällen histologische Veränderungen aufwiesen, die der HS des Menschen ähnelten (PAKOZDY et al., 2011; KLANG et al., 2015). Aufgrund fehlender systematischer Erhebung von gehirnpathologischen Daten, konnte jedoch bisher keine Aussage bezüglich der Häufigkeit des Auftretens dieser hippokampalen Veränderungen getroffen werden.

In der hier vorgestellten Studie wurden daher das Vorkommen und die Ausprägung von Hippokampuspathologien bei epileptischen Katzen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Krankheitsursachen untersucht. Besonderes Augenmerk wurde auf das Auftreten von HS und GCP und deren speziesspezifische Besonderheiten gelegt. Es wurde außerdem analysiert, ob die beim Menschen verwendeten Algorithmen zur Beurteilung epilepsieassoziierter Hippokampuspathologien auch bei der Katze angewendet werden könnten (BLUMCKE et al., 2007; BLUMCKE et al., 2009). Aus diesen Daten konnten schließlich Parallelen und auch Unterschiede zur Pathologie des Pyramiden- und Körnerzellbands des Menschen gezogen werden. Dadurch sollte der Grundstein dafür gelegt werden, dass einerseits die Tiermedizin von der großen Fülle an Informationen über humane HS profitieren kann, und andererseits für die Humanmedizin durch die Möglichkeit der Etablierung der Katze als Spontanmodell für HS neue Erkenntnisse gewonnen werden können.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Allgemeines zu Epilepsie**

#### **1.1. Definition und Vorkommen**

Epilepsie ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen bei Menschen, Hund und Katze. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (ANONYMOUS, 2014a) sind weltweit etwa 50 Millionen Menschen von Epilepsie betroffen. In circa 70 % der Fälle ist die Epilepsie mit Medikamenten behandelbar, doch die restlichen 30% lassen sich mit konservativer Therapie nicht ausreichend kontrollieren.

Seit 1909 gibt es mit der Internationale Liga gegen Epilepsie, englisch International League Against Epilepsy (ILAE) (ANONYMOUS, 2014b), eine medizinische Fachgesellschaft zur Bekämpfung der Epilepsie. Sie beschäftigt sich mit der Verbreitung und Förderung des Wissens über diese Erkrankung mit dem Ziel, die Versorgung der Betroffenen zu verbessern.

Im Rahmen ihrer Tätigkeit erstellt die ILAE auch eine einheitliche Nomenklatur.

Die ILAE definiert einen epileptischen Anfall als abnorme, vorübergehend auftretende, übermäßige oder synchrone neuronale Aktivität im Gehirn.

Unter Epilepsie versteht man die dauerhafte Prädisposition des Gehirns, Anfälle zu generieren.

Um von Epilepsie als Krankheit reden zu können, muss eine der folgenden Möglichkeiten gegeben sein:

- (1) Es müssen mindestens zwei nicht von äußeren Faktoren provozierte Anfälle im Abstand von mehr als 24 Stunden stattgefunden haben.
- (2) Nach einem einzelnen, nicht von außen provozierten epileptischen Anfall kann man mit großer Sicherheit davon ausgehen, dass es zu weiteren Anfällen kommen wird.
- (3) Ein epileptisches Syndrom wurde diagnostiziert. Seit Kurzem werden bei diesen Definitionen auch Reflexepilepsien

berücksichtigt. (FISHER et al., 2005; BERG et al., 2010; FISHER et al., 2014)

## **1.2. Einteilung und Nomenklatur epileptischer Anfälle**

### **1.2.1. Einteilung nach Anfallsursprung**

Nach den Vorgaben der ILAE werden epileptische Anfälle nach ihrem Ursprung im Gehirn in generalisierte oder fokale Anfälle eingeteilt. Bei ersteren breiten sich die Ströme schnell bilateral auf Netzwerke kortikaler und subkortikaler Strukturen aus. Diese Anfälle müssen jedoch nicht immer den gesamten Kortex betreffen und können sich auch asymmetrisch darstellen. Fokale Anfälle dagegen bleiben auf eine Hemisphäre begrenzt. Innerhalb dieser können sie aber sowohl lokalisiert als auch weiter verbreitet auftreten. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass zunächst fokale Anfälle auf die andere Gehirnhälfte übergreifen und somit zu sekundär generalisierten Anfällen werden (BERG et al., 2010).

In der Tiermedizin unterteilt man die Anfälle weitgehend analog. Man spricht von einfachen fokalen Anfällen ohne Bewusstseinsverlust, komplex-fokalen Anfällen mit Beeinträchtigung des Bewusstseins, sekundär generalisierenden fokalen Anfällen und primär generalisierten Anfällen (BERENDT & GRAM, 1999; SCHRIEFL et al., 2008; PAKOZDY et al., 2014; WAHLE et al., 2014).

### **1.2.2. Einteilung nach Anfallsätiologie**

Epilepsien können laut der ILAE auch nach ihrer Ätiologie eingeteilt werden. Man unterscheidet hier drei Gruppen: Genetische Epilepsien, die eine direkte Folge eines Gendefekts darstellen, strukturelle oder metabolische Erkrankungen, durch die es zu Anfällen kommt sowie Epilepsien unbekannter Ursache (BERG et al., 2010).

In der Tiermedizin gibt es bisher keine einheitliche Nomenklatur bezüglich der Anfallsätiologie. Unter den meisten Autoren wird der Begriff der symptomatischen Epilepsie einheitlich verwendet. Dieser ist mit der strukturellen, beziehungsweise metabolischen Epilepsie des Menschen gleichzusetzen (SCHRIEFL et al., 2008; PAKOZDY et al.,

2010). Probleme gibt es bei der Bezeichnung idiopathischer Epilepsien. Da der Begriff bei Hunden im Wesentlichen mit genetischer Epilepsie gleichgesetzt wurde, ist er für Katzen nicht wirklich passend, da es bei Katzen noch keine ausreichenden Beweise für eine genetische Ursache für Epilepsie gibt (KUWABARA et al., 2010b). Auf Grund dessen erscheint es sinnvoller, von Epilepsie unbekannter Ursache oder kryptogener Epilepsie zu sprechen, wenn bei einer Katze kein klarer Grund für die vorhandenen Anfälle gefunden wird, was auch der Nomenklatur der ILAE am ehesten entspricht (BERENDT & GRAM, 1999; SCHRIEFL et al., 2008; PAKOZDY et al., 2010; PAKOZDY et al., 2014; WAHLE et al., 2014).

### **1.3. Die Rolle des Hippocampus für die Epilepsie**

Epileptische Anfälle können ihren Ursprung in verschiedenen Gehirnregionen haben. Der Hippocampus steht aufgrund seines vergleichsweise einfachen Aufbaus und seiner wichtigen Rolle bei der oft therapieresistenten TLE des Menschen besonders im Fokus der Epilepsieforschung.

#### **1.3.1. Anatomie und Histologie**

Der Hippocampus (aus dem Lateinischen: Seepferdchen) ist ein Teil des Archicortex, der sich bogenförmig an die Seitenhörner der Lateralventrikel schmiegt. Dabei verläuft er von den rostro-dorsal gelegenen Nuclei septales zum kaudo-ventralen temporalen Kortex (AMARAL & WITTER, 1989).

Anatomisch unterscheidet man drei verschiedene Regionen: den Gyrus dentatus (DG), den eigentlichen Hippocampus und das Subiculum. Alle diese Regionen haben einen für die Hippokampusregion typischen dreischichtigen Aufbau.

So besteht der DG aus einer Molekularschicht (ML), in der hauptsächlich die Dendriten der Körnerzellen und die Fasern des Tractus perforans enthalten sind, einer Körnerzellschicht (GCL) und einer polymorphen Schicht, die unter anderem die Zellkörper der

Mooszellen beherbergt (AMARAL et al., 2007).

Der Hippocampus an sich wird in vier histologisch unterscheidbare Segmente unterteilt: Cornu ammonis (CA) 4 mit seinen locker in der konkaven Innenfläche des DG verteilten Neuronen und die bandförmig organisierten CA 3, CA 2 und CA 1, die sich am Gehalt und Aussehen der enthaltenen Pyramidenzellen unterscheiden lassen. Auch in den Hippokampussegmenten CA 1 bis CA3 findet sich der oben erwähnte dreischichtige Aufbau: das Stratum oriens ist die tiefste Lage und beinhaltet afferente und efferente Fasern sowie Interneurone. Hierauf folgt das Stratum pyramidale mit den Zellkörpern der Pyramidenzellen und der Interneurone. Die oberste Lage wird nochmals in mehrere Schichten unterteilt. In CA3 unterscheidet man das Stratum lucidum, in welchem die Fasern aus dem DG münden, das Stratum radiatum mit den Dendriten der Pyramidenzellen und das Stratum lacunosum-moleculare, in dem man die apikalen Enden der Dendriten findet. In den Segmenten CA 2 und CA1 ist das Stratum lucidum nicht darstellbar (VAN STRIEN et al., 2009; SENDROWSKI & SOBANIEC, 2013).

### **1.3.2. Afferenzen und Efferenzen**

Die Verbindungen des Hippocampus mit dem Rest des Gehirns werden noch intensiv erforscht. Immer neue Erkenntnisse zu den zu- und ableitenden Bahnen werden gewonnen. Im Folgenden werden die Verknüpfungen im Gehirn der Ratte leicht vereinfacht dargestellt.

Afferente Bahnen erreichen den Hippocampus aus dem Neocortex über die parahippokampale Region. Dies geschieht hauptsächlich durch den Tractus perforans aus den Lagen II bis VI des entorhinalen Kortex (STEWART & SCOVILLE, 1976; DELLER et al., 1996). Diese Bahnen formen 85% der Synapsen in der Molekularschicht mit den Dornen der Körnerzellen des DG (HJORTH-SIMONSEN & JEUNE, 1972). Aufgrund der immunhistochemischen Eigenschaften kann man den Tractus perforans in einen lateralen und einen medialen Anteil unterteilen, wobei die Fasern des lateralen Zugs im oberen und die des medialen Zugs im mittleren Drittel der Molekularschicht enden (TAMAMAKI & NOJYO, 1993). Weitere Bahnen des Tractus perforans enden direkt im



Subiculum, CA1 und CA3. Entgegen früherer Vermutungen, erhält der DG auch kleinere Afferenzen zusätzlich zum Tractus perforans. So zum Beispiel aus dem Pre- und Parasubiculum (KÖHLER, 1985), dem Nucleus septalis medialis (MOSKOWITZ et al., 1973; SWANSON, 1977) und der supramammillären Region (DENT et al., 1983; VERTES, 1992; MAGLOCZKY et al., 1994).

Untereinander werden die Hippokampussegmente durch den polysynaptischen Pfad unidirektional verknüpft. Die Moosfasern des DG inserieren in der CA3-Region. CA3 wiederum ist über die Schaffer-Kollateralen mit CA1 verknüpft, und CA1 entlässt schließlich Fasern zum Subiculum (ANDERSEN et al., 1971; ANDERSEN et al., 2000).

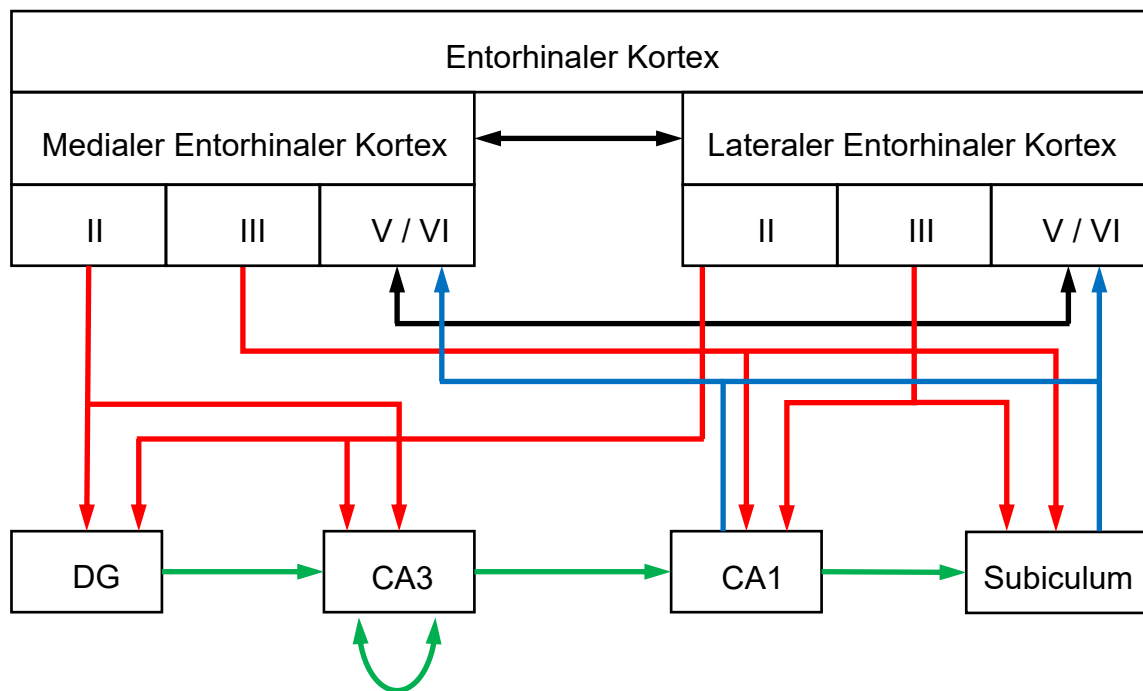
Die efferenten Bahnen verlassen den Hippocampus hauptsächlich vom CA1-Segment und dem Subiculum in Richtung der tiefen Lagen des Entorhinalen Kortex. Vom Entorhinalen Kortex aus werden die Reize unter anderem zur Großhirnrinde, zu Hirnstamm, Hypothalamus und zur Amygdala gesendet (AMARAL et al., 2007; VAN STRIEN et al., 2009; SENDROWSKI & SOBANIEC, 2013).

Die Verbindung von CA2 mit dem Rest der hippocampalen Formation lag bisher im Dunklen. Erst vor kurzem gelang es, die genaueren Verknüpfungen mit den anderen Segmenten zu charakterisieren:

Die Pyramidenzellen des CA2-Segmentes unterscheiden sich schon in Größe und Aussehen von denen der restlichen Sektoren - sie sind größer und besitzen keine komplexen, sondern nur einfache Dendriten. CA2 wird mit dem DG durch Moosfasern verbunden, mit denen die Dendriten der Pyramidenzellen kleine synaptische Boutons formen. Die Projektionen, die das CA2-Segment so erhält, stammen ausschließlich aus der zweiten Lage des Entorhinalen Kortex.

Vom CA2-Sektor aus gehen Fasern in die tiefe Lage des CA1-Segments. Man könnte also von einem alternativen polysynaptischen Pfad sprechen, der vom DG zu CA2 und schließlich zu CA1 führt und möglicherweise mit der anderen Bahn konkurriert (KOHARA et al., 2014).

Funktionell ist bisher bekannt, dass sowohl zwischen DG und CA2, als auch zwischen CA2 und CA3 eine sogenannte *Feed Forward* Hemmung besteht (CHEVALEYRE & SIEGELBAUM, 2010; KOHARA et al., 2014). Außerdem scheinen die Zellen des CA2 für soziale und emotionale Aspekte der Gedächtnisbildung verantwortlich zu sein (HITTI & SIEGELBAUM, 2014; MANKIN et al., 2015) *Siehe hierzu auch Abbildungen 1 und 2.*



**Abbildung 1**

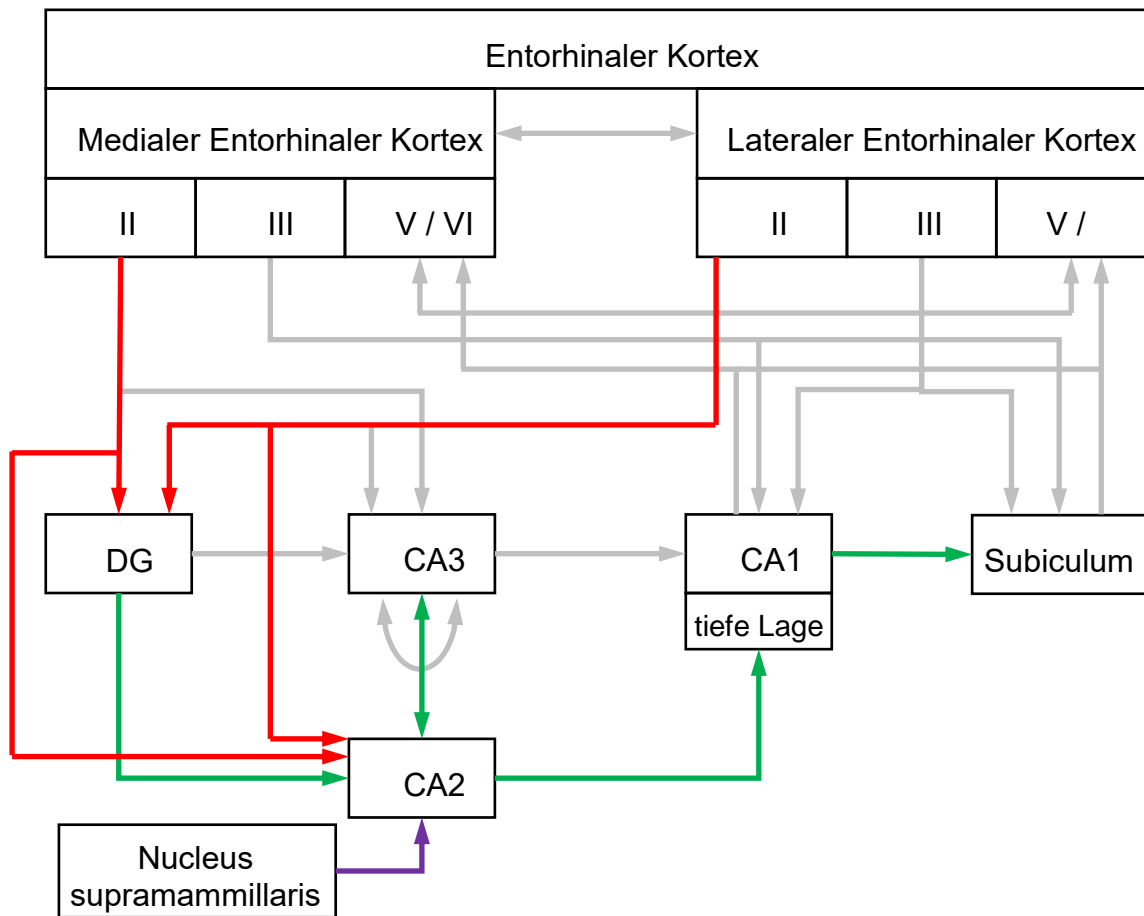
Schematische Darstellung der Verbindungen des Hippocampus mit der Entorhinalen Rinde – klassische Darstellung

Rot: Afferenzen des Entorhinalen Kortex an den eigentlichen Hippocampus.

Blau: Efferenzen des Hippocampus an den Entorhinalen Kortex.

Grün: Polysynaptischer Pfad, der die Hippokampussegmente untereinander verbindet.

Adaptiert nach (VAN STRIEN et al., 2009; SENDROWSKI & SOBANIEC, 2013).



**Abbildung 2**

Schematische Darstellung der Verbindungen des CA2-Segments mit den anderen Anteilen der Hippokampusformation und dem Entorhinalen Kortex. Als einziger Sektor erhält CA2 starke Afferenzen aus dem Hypothalamus über den Nucleus supramammillaris (lila).

Rot: Afferenzen aus der zweiten Lage des Entorhinalen Kortex zum DG und CA2.

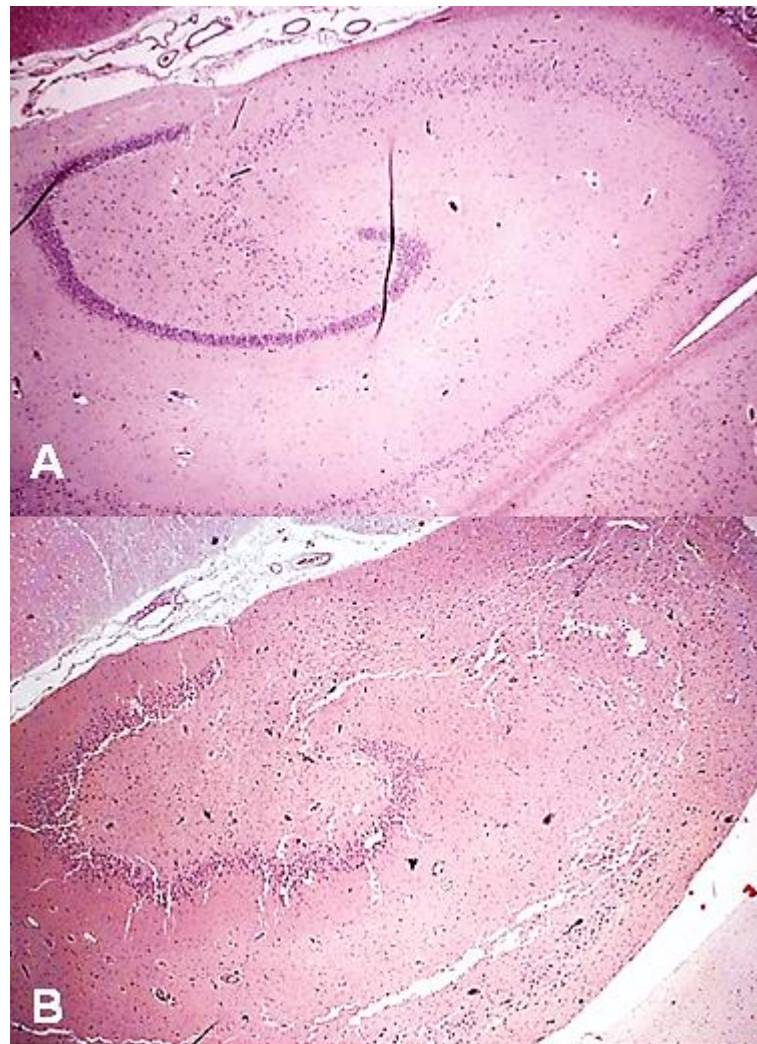
Grün: „alternativer“ polysynaptischer Pfad zwischen DG, CA2 und der tiefen Lage des CA1. Zusätzlich besteht eine gegenseitige Hemmung zwischen CA2 und CA3.

Adaptiert nach (VAN STRIEN et al., 2009; CHEVALEYRE & SIEGELBAUM, 2010; JONES & MCHUGH, 2011; KOHARA et al., 2014)

## 2. Hippokampussklerose beim Menschen

### 2.1. Definition

Unter Hippokampussklerose (HS) versteht man den Verlust von Neuronen aus dem Pyramidenzellband, begleitet von reaktiver Astrogliose. Außerdem können auch Veränderungen im Körnerzellband wie Körnerzelldispersion (GCD) auftreten (HOUSER, 1990; BLUMCKE et al., 2002; WIESER, 2004). *Siehe hierzu Abbildung 3*



**Abbildung 3**

Hippocampus, Katze, H.E. eigenes Bildmaterial (A) physiologisch (B) sklerotischer Hippocampus mit nahezu totalem Verlust der Pyramidenzellen in allen CA Sektoren sowie deutlicher Körnerzelldispersion im DG

Bei HS handelt es sich vermutlich um einen der wichtigsten komplizierenden Faktoren bei pharmakoresistenter TLE (BLUMCKE et al., 2002). Als Synonyme für HS werden die Ammonshornsklerose (die im engeren Sinne ausschließlich die Segmente des Ammonshorns betrifft) und die mesiale Temporallappensklerose (MTS) (die sich auf einen erweiterten Bereich des Hippocampus inklusive Amygdala und Parahippocampus bezieht) verwendet (THOM, 2014).

Im Magnetresonanztomographen (MRT) äußert sich HS in reduziertem Hippokampusvolumen, welches durch die verringerte Zellzahl zu erklären ist (LENCZ et al., 1992; VAN PAESSCHEN et al., 1997). Gesteigerte Signalintensität in der T2-gewichtung spiegelt die entstandene Astrogliose wieder (BRIELLMANN et al., 2002).

## **2.2. Historisches**

Bereits im Jahr 1825 beschrieben Bouchet und Cazauviel Läsionen des Hippocampus bei acht von 18 Autopsiefällen von Patienten mit epileptischen Anfällen und psychischen Erkrankungen. Der Hippocampus wurde als verhärtet, geschrumpft und aufgehell beschrieben. Damals wurde diesen Funden jedoch nicht allzu große Bedeutung beigemessen (BOUCHET, 1825). Später rückte die HS bei Epileptikern immer mehr in den Fokus der Wissenschaft und es gab immer wieder Fallberichte auf makroskopischer und zellulärer Ebene.

Im Jahr 1966 publizierten Margerison und Corsellis die erste größere Studie, die klinische, elektro-enzephalographische und pathologische Befunde in Zusammenhang brachte. Insgesamt 55 Patienten wurden in dieser Studie untersucht. Bei 65% der untersuchten Hippocampi wurden sklerotische Veränderungen gefunden. Hierbei beschrieben die Autoren verschiedene Muster des Nervenzellverlustes ebenso wie teilweise eine asymmetrische Verteilung der Veränderungen auf die beiden Gehirnhälften. Außerdem fanden sie bei 72% der untersuchten Patienten eine Übereinstimmung der Befunde der drei verwendeten Untersuchungsmethoden (MARGERISON & CORSELLIS, 1966).

### 2.3. Ätiologie

Obwohl es mittlerweile eine große Menge an Daten über das Auftreten und die klinischen und pathologischen Aspekte der HS gibt, geht die Debatte über ihren Ursprung weiter.

Seit der Entdeckung von HS wird darüber diskutiert, was sie auslöst und ob es sich um die Ursache, oder eine Folge der Krämpfe handelt. Bis heute konnten keine konkreten Schlüsse darüber gezogen werden.

Eine der prominenten, frühen Theorien zur Entstehung der HS ist die, dass die Veränderungen des besonders für Hypoxie anfälligen Hippocampus durch eine Unterversorgung mit Sauerstoff und Blut verursacht werden. Als Ursache hierfür wurden sowohl Komplikationen bei der Geburt, als auch andere Störungen bis in die frühe Pubertät hinein diskutiert (MEYER et al., 1954). Bei dieser Hypothese wurde weiter argumentiert, dass es sich bei HS um eine post-hypoxische Narbenbildung handle, die sich dann durch epileptische Anfälle äußere. Die Narbe interferiere hierbei mit der normalen Gehirnaktivität und trage so zur Entstehung und Erhaltung von Epilepsie bei (MARGERISON & CORSELLIS, 1966).

Als eine weitere mögliche Ursache der HS wird auch hohes Fieber im frühen Kindesalter genannt (MEYER et al., 1954; BLUMCKE et al., 2002). Auch neuere Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen durch Fieber verursachtem Status epilepticus (SE) und dem Auftreten von Anzeichen von HS im MRT. So fand man bei knapp 10% der untersuchten Kinder kurz nach einem durch Fieber ausgelösten SE, hyperintense Bereiche des Hippocampus in der T2-Wichtung (hinweisend auf postiktale Schäden). Wiederum bei 85% der Kinder mit akuten Veränderungen zeigten sich, bei späterer Wiederholung der MRT-Untersuchung, Anzeichen für HS wie T2-Signalintensivierung und reduziertes Hippokampusvolumen (LEWIS et al., 2014).

Entzündung im Gehirn könnte ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung der HS spielen. So wurde beispielsweise festgestellt, dass in HS-betroffenen Hippocampi die mikroRNAs miR-124, miR-92b, miR-138 in den Sektoren CA1, CA2, CA3 und CA4 weniger exprimiert werden. Des

Weiteren stellte man fest, dass besonders mikroRNAs, die für die Immunantwort verantwortlich sind, bei HS dysreguliert waren, zum Beispiel jene, die für Expression von Chemokin-ligand-3, Chemokin-ligand-22 und intrazellulärem Adhäsionsmolekül 1 verantwortlich sind. Auch immunhistochemische Untersuchungen bestätigten die erhöhte Expression von Letzterem in Astrozyten und Blutgefäßen (KAN et al., 2012). Eine andere Studie bestätigte diese Befunde. Außerdem wurde hier über die ausschließlich bei HS gesteigerte Infiltration des Hippocampus mit CD8 und CD4-positiven T-Lymphozyten berichtet (Ausgenommen ist hier HS infolge einer Enzephalitis) (NAKAHARA et al., 2010).

Auch eine gestörte Mitochondrienfunktion könnte für HS verantwortlich sein. Analysen der mitochondrialen DNA (AZAKLI et al., 2013) und RNA (GURSES et al., 2014) konnten in HS-positiven Gewebeproben vermehrte Mutationen nachweisen, die einen Anteil an der Pathogenese der HS haben könnten. Außerdem fand man verschiedene Veränderungen von mit der Mitochondrienfunktion assoziierten Proteinen (LIU et al., 2008).

Mithilfe von Proteinanalysen wurden außerdem Veränderungen, die das Zytoskelett beeinflussen identifiziert. So fand man Expressionsänderungen von insgesamt 29 Proteinen in HS-betroffenen Autopsieproben. Zu den Folgen wurden Veränderungen der Neurotransmitter, des glykolytischen Stoffwechsels, zytoprotektiver Proteine und Strukturproteine gezählt, die vermutlich zu einer geringeren Energiebereitstellung und somit zu Schäden an den Zellen und Störungen in der Neurotransmitter-Kaskade führen könnten (HE et al., 2006). Auch besonders die Eiweiße der Mikrotubuli werden beeinflusst, was sich ebenfalls in Veränderungen von Größe und Aussehen sowie des axonalen Transports und der Verteilung der Organellen äußern kann (LIU et al., 2008).

Zuletzt muss noch auf eine mögliche genetische oder malformative Genese hingewiesen werden. Schon früh wurde man auf eine familiäre Häufung temporaler Epilepsien aufmerksam (MARGERISON & CORSELLIS, 1966). In dieser Studie gab es bei 16 von 36 untersuchten

Patienten mit HS eine familiäre Prädisposition für epileptische Anfälle. Für eine malformative Genese spricht, dass nur limbische Anfälle und andere prädisponierende Faktoren allein vermutlich keine HS auslösen können. Bei HS-Patienten sind häufig zusätzlich eine gesteigerte Neurogenese-Rate und länger erhaltene Cajal-Retzius-Zellen als ein Hinweis auf einen abnormen Reifungsprozess zu sehen (BLUMCKE et al., 2002).

#### **2.4. HS und Demenz**

Eine besondere Entität der HS bildet die alters- oder demenz-assoziierte HS.

Es wurde festgestellt, dass ältere Leute im MRT häufiger Veränderungen zeigten, die auf HS hindeuten. Diese gingen jedoch nicht mit einer Vorgeschichte von Anfällen einher, sondern stattdessen mit kognitiven Defiziten (DICKSON et al., 1994).

Die Prävalenz dieser Veränderung liegt um die 10 bis 15% bei über 80-Jährigen mit steigender Tendenz, je höher das Lebensalter ist (NELSON et al., 2011).

In der Histologie stellen sich die Veränderungen der beiden HS-Unterarten sehr ähnlich dar. Allerdings sind die Veränderungen bei der altersassoziierten HS meistens milder. Auch der Grad der Ausprägung der Moosfasern fällt meist geringer aus, als bei der epilepsieassoziierten HS (BANDOPADHYAY et al., 2014).

Die altersassoziierte HS stellt also bei alten Menschen eine wichtige Differentialdiagnose zur epilepsieassoziierten HS dar.

#### **2.5. Mit HS assoziierte Körnerzellpathologie**

Zusätzlich zum Nervenzellverlust im Pyramidenzellband zählen auch Veränderungen des Körnerzellbands (GCP) zur HS. Das erste Mal beim Menschen beschrieb dies Houser im Jahr 1990. Sie untersuchte das Vorkommen der bereits länger beim Versuchstier bekannten Veränderungen (NADLER et al., 1980; SLOVITER, 1992), die sich in



vermehrt gebildeten Moos-Fasern, sowie dem Auftreten weit auseinandergedrängter Körnerzellen mit einer Verschiebung der Grenze in die Molekularschicht hinein darstellen (HOUSER, 1990; HOUSER et al., 1990). Diese Veränderungen treten bei zwischen 50 und 86 % der von HS Betroffenen auf (HOUSER, 1990; EL BAHH et al., 1999; THOM et al., 2005). Allerdings tritt GCP nicht exklusiv bei Epileptikern, sondern häufig auch bei Demenzkranken auf (DICKSON et al., 1994; BANDOPADHYAY et al., 2014). Mit der dem DG eigenen Rolle als „Schaltzentrale“ für die Verbreitung der Informationen durch den Hippocampus wundert es nicht, dass besonders Personen mit HS und GCP bei Gedächtnistests schlechter abschneiden, als solche, die nur unter HS alleine leiden (PAULI et al., 2006; BLUMCKE et al., 2009).

Die genauen Mechanismen der Entstehung von GCP liegen bisher noch im Dunklen. Ebenso stellt sich die Frage, ob die Veränderungen des Körnerzellbands die Entstehung epileptischer Anfälle fördern, oder ob sie lediglich eine Folge dieser sind. Zum Ursprung der GCP gibt es vor allem zwei Prominente Theorien. Im Prinzip basieren beide Argumentationen auf der Erkenntnis, dass der adulte menschliche Hippocampus in der Lage ist, neue Körnerzellen aus der Subgranularzone (SGZ) heraus zu generieren (ERIKSSON et al., 1998).

Eine Sichtweise auf die Bildung von GCP ist, dass epileptische Anfälle eine gesteigerte Neurogeneserate im DG hervorrufen und so die Architektur desselben durch die neu gebildeten Zellen verändern (PARENT et al., 1997; JESSBERGER et al., 2005). Die andere Anschauung stützt sich dagegen nicht auf die neue Entstehung von Körnerzellen, sondern auf eine abnorme Wanderung bereits existenter, adulter Zellen (MAGLOCZKY et al., 2000). Schon früh wurde an Mäusen beobachtet, dass ein Mangel an Reelin zu abnormer Zellarchitektur in verschiedenen Gehirnnarealen inklusive des Hippocampus führt (CAVINESS, 1973). So wird postuliert, dass die durch die Anfälle im Gehirn gesetzten Schäden durch lokale Veränderungen im Reelin-System zu abnormer Wanderung reifer Körnerzellen und so zu den strukturellen Veränderungen des DG führen

könnten (FAHRNER et al., 2007).

## 2.6. Grading-Systeme für humane HS

Nachdem HS immer mehr in den Fokus der Forschung rückte, wurden über die Jahre verschiedene Systeme entwickelt, die eine Klassifizierung in verschiedene Gruppen anhand des Musters und des Schweregrades des Zellverlustes, der Moos-Faser-Sprossung oder des berechneten Volumens im MRT erlauben sollten.

### 2.6.1. Nach Wyler et al. (1992)

Es handelt sich hierbei um ein semiquantitatives histopathologisches Einteilungsschema. Die *National Institutes of Health* regten Anfang der 1990er Jahre die Entwicklung eines Konsensusprotokolls für die Beurteilung des Schweregrads der HS nach Hippokampektomie an. Man erhoffte sich hiervon bessere Erkenntnisse über den postchirurgischen Ausgang.

Vorher war eine Quantifizierung der Zellzahlen nur mit aufwändigen computerbasierten Zählmethoden möglich. Der Vorteil dieses Schemas sollte die Durchführbarkeit an routinemäßigen Hämalaun-Eosin-Färbungen (HE) ohne zusätzlichen apparativen Aufwand sein.

Wyler teilte den Grad der HS in fünf verschiedene Stufen ein:

*a. No hippocampal pathology present*

Der Hippocampus zeigt keine der im Folgenden gelisteten Veränderungen.

*b. Grade I Mesial temporal damage (MTD)*

Gliose assoziiert mit weniger als 10% Zellverlust in den Sektoren CA1, CA3 und/oder CA4.

*c. Grade II MTD*

Gliose in Verbindung mit 10 bis 50% Nervenzellausfall in den Segmenten CA1, CA3 und/oder CA4.

Betrifft die Veränderung ausschließlich CA3 und CA4, spricht man von

*end-folium-sclerosis*

*d. Grade III MTD*

Auch als klassische HS bezeichnet. Bezieht sich auf Gliose, verbunden mit Zelleinbußen von weniger als 50% in den Sektoren CA1, CA3 und CA4, nicht aber im CA2 Sektor.

*e. Grade IV MTD*

Wird auch totale HS genannt. Hierbei handelt es sich um einen Schwund der Pyramidenzellen um mehr als 50% in allen CA-Segmenten, begleitet von Gliose.

Das Einteilungssystem wurde von drei verschiedenen Pathologen an denselben Proben getestet. Die Übereinstimmung der verschiedenen Auswertungen war mit 85% sehr hoch und differierte maximal um ein Grad.

Dieses System zeichnet sich besonders durch seine einfache Durchführbarkeit und gute Vergleichbarkeit auch bei verschiedenen Auswertern aus.

Bei einer prospektiven Studie mithilfe dieses Schemas zeigte sich wenig später, dass Patienten mit stärkerer HS mehr von einer operativen Entfernung des Hippocampus profitierten und, verglichen mit der Ausgangssituation, zu einem geringeren Maß an Gedächtnisverlust litten (WYLER et al., 1992).

### **2.6.2. Nach Watson et al. (1996)**

Dieses Einteilungsschema verbindet MRT-erzeugte Volumenmessungen des Hippocampus mit der von Wyler etablierten histopathologischen Klassifikation.

Watson et al. (1996) ergänzten das Wyler-Schema um einen zusätzlichen Grad, der zwischen den ursprünglichen Graden II und III liegen sollte. Dieser repräsentierte Gliose begleitet von über 50% Zellverlust in CA1 und 10–50% Schwund in CA3 und/oder CA4 mit Aussparung des CA2-Segments. Das veränderte Einteilungssystem wurde somit sechsstufig.

Es war bereits bekannt, dass ein reduziertes hippocampales Volumen im MRT mit der Neuropathologie und dem postchirurgischen Ergebnis korrelieren (CASCINO et al., 1991; LENCZ et al., 1992), also wollte man es schaffen, den Grad der HS bereits präoperativ so genau wie möglich zu bestimmen.

Hierzu wurden in einem 1,5 Tesla Kernspintomographen sagittale Schnitte mit einer Dicke von 7 mm erzeugt. In jedem dieser Schnitte wurde die Fläche des Hippocampus bestimmt und anschließend das Volumen für den Schnitt berechnet. Alle Schnitte addiert ergaben schließlich das Gesamtvolumen des Hippocampus. Betrachtet wurde allerdings nicht der einzelne Hippocampus, sondern die Symmetrie zwischen den beiden Gehirnhälften, indem das Volumen des abnormalen durch das des normalen Hippocampus geteilt wurde.

Bei Kontrolluntersuchungen lag der Symmetrieindex im Durchschnitt bei 0,97. Ein guter Zusammenhang zwischen der Asymmetrie und dem Grad der HS wurde festgestellt. So gab es bei Fällen ohne HS keine nennenswerten Seitenunterschiede. Bei den Graden I und II zeigte sich eine milde Verschiebung der Seiten von 0,85 bis 0,9. Die Grade III und IV präsentierten bereits eine moderate bis starke Asymmetrie der Hippocampi mit Werten zwischen 0,6 und 0,8. Die am schlimmsten von HS betroffenen Fälle wiesen schließlich auch die stärksten Seitenunterschiede mit Symmetrieindex-Werten unter 0,6 auf.

Mit diesem Schema war es nun also möglich, schon vor einer Operation anhand des Verhältnisses des linken und rechten Hippocampus zueinander eine Prognose über den Ausgang nach der Operation zu stellen (WATSON et al., 1996).

### **2.6.3. Nach Proper et al. (2001)**

In diesem Beurteilungsschema sollte ermittelt werden, ob eine Einteilung der HS auch anhand der Moos-Fasern möglich sei.

Die Wyler-Methode hatte sich zwar als zuverlässig und leicht durchführbar erwiesen, jedoch brauchte man den gesamten

Hippocampus, um reproduzierbare Werte zu erhalten.

Für dieses Schema wurden die Moosfasern mithilfe der Timm-Färbung dargestellt. Die Patienten wurden nach dem Wyler-Grad in drei Gruppen eingeteilt: keine Pathologie (Grad 0), moderate HS (Grad III) und starke HS (Grad IV).

Zur Überprüfung der Methode wurde zusätzlich zum Wyler-Grad eine Zellzählung durchgeführt und durch Volumenmessungen des Hippocampus im MRT ergänzt.

Zur Bestimmung der Moosfasersprossung (MFS) wurden die optische Dichte der SGZ und die der polymorphischen Zone ins Verhältnis gesetzt.

Eine klare Abgrenzung zwischen den drei eingeteilten Gruppen anhand der MFS konnte gezeigt werden. Bei Grad 0 fanden sich axonale Endigungen der Moosfasern im Bereich der CA3 und CA4, nicht jedoch in der SGZ. Mit Wyler Grad III ging eine höhere Dichte der MF-Enden in den Bereichen CA3 und CA4 sowie Einsprossung in die SGZ einher. Bei Wyler Grad IV stellte sich im Gegenteil zum Grad III eine reduzierte MFS im CA4-Sektor dar.

Auch statistisch ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen nachweisen.

Die Autoren schlussfolgerten, dass die Einteilung der HS anhand der MFS sehr genau sei und sich des Weiteren besser bei geringer Probengröße eigne, da man keinen perfekten Schnitt durch alle CA-Segmente zur genauen Beurteilung brauche (PROPER et al., 2001).

#### **2.6.4. Nach Blümcke et al.**

##### **2.6.4.1. Kliniko-pathologisches Klassifizierungssystem für mesiale Temporallappensklerose (2007)**

Im Jahr 2007 publizierten Blümcke et al. das erste quantitative Einteilungsschema für MTS. Hiermit sollten Subtypen der MTS weiter untersucht werden, um die Ergebnisse nach einem chirurgischen

Eingriff besser vorhersagen zu können.

Die Etablierung dieses Schemas wurde an chirurgisch entfernten Hippocampi von 178 an TLE leidenden Patienten durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen den Neuronalen Kern (NeuN) markiert. Die Zellen wurden bei 200-facher (Pyramidenzellband) oder 400-facher (Körnerzellband) Vergrößerung erfasst und anschließend die mittlere Menge von Neuronen pro Quadratmillimeter errechnet.

Es wurden insgesamt fünf verschiedene Muster der MTS beschrieben:

- a. No MTS: keine Veränderung der Nervenzelldichte im Pyramidenzellband oder DG.
- b. MTS 1a, gleichzusetzen mit der klassischen HS, gekennzeichnet durch einen mittleren Zellverlust von 30 – 40% besonders im CA1 und CA4-Segment unter Aussparung von CA2.
- c. MTS 1b, auch hochgradige HS, dargestellt durch schwerwiegenden Nervenzellschwund von über 50% im CA2 und etwa 70 – 80% in allen anderen Segmenten.
- d. MTS 2 als eine bisher nicht dargestellte Unterart der HS, die hauptsächlich den CA1-Sektor betrifft (Verlust von etwa 80% der Neurone), die anderen Sektoren bleiben weitgehend verschont (Verluste von etwa 20%).
- e. MTS 3 oder auch end-folium sclerosis, bei der sich der Ausfall der Nervenzellen auf das CA4-Segment konzentriert (etwa 50%).

Es wurde in dieser Studie eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der HS und der Dauer der Epilepsieerkrankung festgestellt. So war bei no MTS und MTS3-Betroffenen die Dauer der Erkrankung deutlich kürzer als bei den anderen Mustern. Zu verschiedenen anderen Parametern (Alter beim chirurgischen Eingriff, Alter bei Beginn der Anfälle, Anfallsfrequenz) wurde jedoch kein Zusammenhang festgestellt. Des Weiteren fiel auf, dass Patienten mit stärkerem Nervenzellverlust ein initiales präzipitierendes Ereignis (IPI) in jüngeren Jahren erlebt hatten.

Bezüglich der Veränderungen am DG zeigte sich, dass die Typen MTS

1a und 1b mit 52 beziehungsweise 61% respektive die höchste Rate an GCD aufwiesen, während die „atypischen“ MTS-Formen mit nur 20% bei MTS 2 und 0% bei MTS 3 kaum Veränderungen des DG aufwiesen.

Es zeigte sich schließlich, dass Patienten mit den „klassischen“ Nervenzellverlust-Mustern, mit über 85% Anfallsfreiheit nach einem Jahr, eine bessere Prognose nach chirurgischer Entfernung des Hippocampus aufwiesen, als jene mit „atypischen“ Mustern (nur 28% der MTS3-betroffenen Patienten waren ein Jahr nach der Operation anfallsfrei) (BLUMCKE et al., 2007).

#### **2.6.4.2. Konsensus-Protokoll der ILAE zur Einteilung der HS (2013)**

Um eine bessere Vorhersage über den Erfolg der chirurgischen Behandlung und die verbleibende Qualität des Erinnerungsvermögens erreichen zu können, etablierte eine Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Blümcke im Auftrag der ILAE ein weiteres Einteilungsschema zur HS. Dieses basiert, zur besseren Durchführbarkeit, auf qualitativ erhobenen histopathologischen Daten chirurgisch entfernter Hippocampi von TLE-Patienten.

Unterschieden wurden vier Stadien:

- a. No HS: 20% der untersuchten TLE-Patienten wiesen keinerlei Nervenzellverluste des Pyramidenzellbandes auf. Verschiedene schweregrade der Gliose konnten in diesen Fällen jedoch festgestellt werden.
- b. HS ILAE Type 1: dies war mit 60 – 80% die am häufigsten vorkommende Form der HS. Hier traten im CA1-Segment die schwerwiegendsten Verluste auf (>80%), gefolgt von CA4, CA3 und zuletzt CA2. Der DG war hier mit etwa 50 – 60% Zellverlust betroffen.
- c. HS ILAE Type 2 oder auch CA1-überwiegend (>80% Zellverlust) trat nur selten in etwa 5 – 10% der untersuchten Gewebe auf. Der Zelluntergang der restlichen Sektoren ist mit bloßem Auge kaum zu bemerken.

d. HS ILAE Type 3 oder CA4-überwiegend (>50% reduzierte Zelldichte), des Weiteren betroffen war der DG mit etwa 35% Verlusten. Dieses Muster der HS war mit 4 – 7% das am seltensten auftretende.

Diese Methode wurde durch die Analyse von Inter- und Intrarater-Variabilitäten validiert. Hierzu wurden ausgewählte Präparate durch 10 Pathologen verschiedener Nationalitäten ausgewertet. Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden die Auswertungen jeweils viermal wiederholt.

Aufgrund der Analysen wurde auf eine Unterscheidung zwischen einer moderaten und einer schwerwiegenden HS verzichtet, da diese selbst von erfahrenen Neuropathologen nur schwer mit Sicherheit festgestellt werden konnte. Bei der hier aufgeführten Klassifizierung wurde nach der zweiten Untersuchung durch alle Beteiligten eine verlässliche Unterscheidung der verschiedenen Muster erreicht. (BLUMCKE et al., 2013b)

#### **2.6.4.3. Kliniko-pathologisches Einteilungsschema der Körnerzelldispersion (2009)**

Die GCP wurde zwar bei den bisher dargestellten Einteilungsschemata berücksichtigt, jedoch wurde nie speziell auf die auftretenden Muster eingegangen.

Nachdem über die möglichen Auswirkungen der GCP auf die Epilepsie und das Erinnerungsvermögen noch Unklarheit herrscht, wollten Blümcke et al. in dieser Studie die verschiedenen Ausprägungen der GCP analysieren und ihren Zusammenhang mit verschiedenen klinischen Parametern untersuchen.

Hierzu wurden die Zelldichte pro Quadratmillimeter, die mittleren Abstände zwischen den Zellen, die Dicke des Körnerzellbandes und die Anzahl der Zelllagen bestimmt. Außerdem wurden verschiedene pathologische Muster der GCL festgestellt. Die Veränderungen wurden in zwei große Gruppen eingeteilt:



- a. GCP type 1: diese Gruppe bezieht sich auf Veränderungen der GCL die im Wesentlichen auf Zellverlust zurückzuführen sind. Hierzu zählen die Ausdünnung der GCL (häufigste Veränderung, festgestellt in 81,3% der untersuchten Gewebe) und die Bildung von Lücken durch lokale Unterbrechung der Körnerzellbands.
- b. GCP type 2 bezeichnet Veränderungen die aufgrund einer gestörten Architektur der GCL entstehen. Darunter fallen einzelne ektopische Körnerzellen, die in der ML liegen, Cluster von ektopischen Zellen in der ML, Zweilagigkeit der GCL und Dispersion der Körnerzellen (gekennzeichnet durch eine Verbreiterung der GCL mit weiteren Zellabständen und einer unklaren Grenze zwischen der GCL und der ML).

Bei 11,5% der Patienten wurde keine GCP festgestellt, diese Patienten hatten bessere Ergebnisse bei Gedächtnis-Tests als jene mit GCP. Außerdem hatten Patienten mit GCP type 2 eine deutlich längere Krankheitsdauer als andere Patienten gehabt.

Wurden die Veränderungen des DG mit den Veränderungen des Pyramidenzellbandes in Verbindung gebracht, zeigte sich, dass bei schlimmeren Ausprägungen der HS auch eine stärkere Veränderung des DG zu erwarten war. Dem entsprechend wiesen in dieser Studie die Patienten mit GCP eine deutlichere Verbesserung nach Hippokampektomie auf, als solche ohne Störungen des GCL.

### **3. Tiermodelle für Epilepsie**

Zur Erforschung neuer antiepileptischer Medikamente (AED) und zur Aufklärung der unterliegenden Pathomechanismen sind Tiermodelle unerlässlich.

Zur Feststellung der krampfblockierenden Wirksamkeit verschiedener Moleküle werden sogenannte akute Epilepsiemodelle verwendet, in denen durch elektrische Impulse (SWINYARD et al., 1952) oder Chemikalien wie Pentylentetrazol (SANTUCCI et al., 1985) oder Bicucullin (FRANKLIN et al., 1988) bei Ratten oder Mäusen

Krampfanfälle ausgelöst werden. Dieses Modell ist gut reproduzierbar, günstig und relativ einfach durchzuführen. Da es auf eigentlich gesunden Tieren basiert und die Anfälle künstlich erzeugt werden, hat es aber den Nachteil, dass es sich nicht für die Evaluierung der Entstehung und Entwicklung der Epilepsie eignet. Außerdem gab es mit den akuten Epilepsiemodellen immer wieder Über- oder Unterschätzungen der Wirksamkeit einzelner Medikamente (LOSCHER, 2002).

Aufgrund der oben genannten Limitierungen, etablierte man zusätzlich verschiedene Modelle der chronischen Epilepsie. Zunächst kann man zwischen Modellen für symptomatische und idiopathische Epilepsie unterscheiden. Zu den idiopathischen Modellen gehören Tiere mit natürlich entstandenen oder erzeugten Mutationen, aufgrund derer Anfälle entstehen. Hierzu zählen Tiere mit Reflexepilepsie (MILLAN et al., 1986) und solche mit spontan rezidivierenden Anfällen (SRS) (KAPLAN et al., 1979) oder stark reduzierter Krampfschwelle durch induzierte Mutationen oder Gen-Knock-outs (REIGEL et al., 1986). Die Gruppe der symptomatischen Epilepsiemodelle wird weiter aufgeteilt in Kindling-Modelle und Modelle mit spontan auftretenden Anfällen nach einem selbsterhaltenden SE (SSSE) (LOSCHER, 2002). *Siehe zur Veranschaulichung auch Abbildung 4*

### Modelle akuter Epilepsie

- Elektrisch (SWINYARD et al., 1952)
- Chemisch (FRANKLIN et al., 1988, SANTUCCI et al., 1985)

### Modelle chronischer Epilepsie

- Idiopathische Epilepsie
  - Reflexepilepsien (MILLAN et al., 1986)
  - Induzierte Mutationen (KAPLAN et al., 1979, REIGEL et al., 1986)
- Symptomatische Epilepsie
  - Kindling-Modelle (RACINE, 1972; MCNAMARA, 1984; LOSCHER et al., 1986)
  - Selbst-erhaltender Status epilepticus
    - Pilocarpin (TURSKI et al., 1983)
    - Kainsäure (CAVALHEIRO et al., 1982, NADLER et al., 1978)
    - Eklektisch induziert (VICEDOMINI & NADLER, 1987)

**Abbildung 4:** Aufteilung der verschiedenen Tiermodelle für Epilepsie (frei nach (LOSCHER, 2002; LOSCHER, 2011))

Eine Besonderheit unter den sonst nur an warmblütigen Wirbeltieren (vorwiegend Labornager wie Mäuse und Ratten) charakterisierten Epilepsiemodellen stellt die seit kurzem entdeckte Möglichkeit dar, Zebrafische zur Epilepsieforschung zu verwenden. Die hauptsächlichen Vorteile dieser Tiere als Modell liegen zunächst darin, dass sie, chemisch induziert (BARABAN et al., 2005; ALFARO et al., 2011) oder durch Mutationen (HORTOPAN et al., 2010), epileptische Anfälle zeigen, die in ihren wesentlichen Zügen denen bei standardisierten Tiermodellen ähneln. Zusätzlich hierzu können weitere Charakteristiken von Vorteil sein. Zum Beispiel das komplett sequenzierte Genom, die schnellere Entwicklung und die längere Lebensspanne der Zebrafische (STEWART et al., 2012). Nichts desto trotz muss dieses Modell noch besser charakterisiert und standardisiert werden. Im Folgenden werden die klassischen Modelle der symptomatischen Epilepsie genauer beleuchtet, da diese besonders als Modelle der TLE beim Menschen gelten (LOSCHER, 2002; LOSCHER, 2011; POTSCHKA, 2013).

### **3.1. Kindling-Modelle**

#### **3.1.1. Kindling-Modelle an Labornagern**

Bei diesem Modell der TLE werden zunächst Stimulations- und Aufzeichnungselektroden im Gehirn implantiert. Nach einer Erholungsphase werden immer wieder subkonvulsive elektrische Spannungen angelegt (RACINE, 1972; MCNAMARA, 1984; LOSCHER et al., 1986). Der erstmals im Jahre 1967 beschriebene (GODDARD, 1967) Kindling-Effekt besteht darin, dass durch die tägliche Wiederholung der niedrigen elektrischen Spannung eine dauerhafte Veränderung der neuronalen Schaltkreise herbeigeführt wird. Diese Veränderungen äußern sich in einer deutlich erniedrigten Krampfschwelle, sodass zum Ende des Prozesses bereits sehr niedrige Spannungen generalisierte Anfälle bei den Tieren auslösen. Dieser Effekt ist irreversibel und dauerhaft anhaltend (MCNAMARA, 1984).

Des Weiteren studierte Goddard in seiner Arbeit die Sensitivität verschiedener Gehirnareale für Kindling. Hierbei erwies sich die Amygdala als die empfindlichste Gehirnregion zur Auslösung der Krämpfe (GODDARD et al., 1969).

Nur ein paar Jahre später teilte Racine in seiner Arbeit die Anfälle während dem Kindlingprozess in verschiedene Stadien ein. Zunächst zeigten sich bei den untersuchten Ratten (1) Bewegungen des Gesichts, gefolgt von (2) Kopfnicken, (3) Klonus der Vordergliedmaßen, (4) Aufbäumen und schließlich (5) Aufbäumen und Fallen. Im fünften Stadium zeigten sich komplett ausgebildete motorische Anfälle. Diese Tiere gelten als voll gekindelt (RACINE, 1972).

Dieses Modell für TLE spiegelt nicht nur im klinischen Sinne die typischen Anfälle wider, sondern auch die pathomorphologischen Veränderungen des Hippocampus ähneln dem natürlichen Krankheitsbild. So entstehen im Laufe des Kindlingprozesses Nervenzellverlust im DG (CAVAZOS & SUTULA, 1990) und auch MFS (REPRESA et al., 1989), welche im Verlauf des Kindlings immer weiter zunimmt (CAVAZOS et al., 1991).

Auch zur Erprobung neuer Medikamente für pharmakoresistente Epilepsie hat sich das Kindlingmodell als hilfreich erwiesen (LOSCHER

et al., 1986). Es ist für diesen speziellen Fall weitaus sensibler, wird jedoch durch die aufwändige und langwierige Durchführung des Versuchsaufbaus limitiert (LOSCHER, 2002).

### **3.1.2. Kindling-Modelle an Hund und Katze**

Neben Labornagern wurde Kindling auch an Hunden und Katzen angewendet. Das Vorgehen war hierbei dasselbe wie bei den Labornagern.

Bei Hunden entwickelten sich schnell generalisierte Anfälle, die nur anfangs die für gekindelte Ratten typische psychomotorische Komponente zeigten. Außerdem war eine Einteilung in verschiedene Stadien beim Hund nicht möglich (THOMPSON & GALOSY, 1983). Die Tiere waren schwer zu betreuen und zu behandeln, da sie häufig spontan auftretende generalisierte Anfälle oder auch SE entwickelten (WAUQUIER et al., 1979).

Bei Katzen dagegen stellte sich der Kindlingprozess dem bei Ratten viel ähnlicher dar - es zeigten sich zunächst fokale limbische Anfälle die schließlich generalisierten (DELGADO & SEVILLANO, 1961). In einer vergleichenden Studie von Goddard et al. wurde des Weiteren festgestellt, dass das Kindling bei Katzen, wie auch bei Ratten und auch Affen einen dauerhaften, irreversiblen Prozess darstellte, der die Krampfschwelle des Gehirns auch lange nach dem eigentlichen Kindling erniedrigte (GODDARD et al., 1969).

Vergleichbar mit Nagern, wurde der Kindlingprozess der Amygdala bei der Katze in sechs verschiedene Stadien eingeteilt: im Laufe des Vorgangs entwickelte sich zunächst (1) einseitiges Zucken der Gesichtsmuskulatur, (2) beidseitige Zuckungen im Gesicht, (3) Kopfnicken, (4) Drehen des Kopfes zur nicht gekindelten Seite mit gleichzeitiger Streckung der kontralateralen Vordergliedmaße, (5) generalisierte klonische Zuckungen und schließlich (6) ein „voller“ generalisierter Krampfanfall (WADA et al., 1986a).

Ein Modell für photische Epilepsie bei der Katze wurde von Wada et. al.

durch Kindling des lateralen Corpus geniculatum vorgeschlagen. Der Kindlingprozess ging in diesem Fall schneller voran als bei Stimulation der Amygdala. Außerdem zeigte sich nach einiger Zeit eine Regression der Anfälle. Dafür induzierte man hier aber reproduzierbar Photosensitivität bei den Katzen (WADA et al., 1986a). In Kombination mit der Applikation des GABA-Inhibitors Allylglyzin potenzierte sich die Lichtempfindlichkeit der Tiere, und somit sah man hier ein gutes Modell für photische Epilepsie (WADA et al., 1986b).

Auch die Auswirkung epileptischer Anfälle auf den Schlaf wurde an gekindelten Katzen erforscht. Es zeigte sich, dass – wie von humanen Patienten berichtet – die Anfälle den Schlafrhythmus veränderten. Eine Verschiebung von weniger REM-Schlaf zu mehr Wachzeit wurde beobachtet (TANAKA & NAQUET, 1975). Außerdem stellte man eine Art Rebound-Effekt fest. Kurz nach einem Anfall erhöhte sich die Konzentration der Monoamine Norepinephrin, Serotonin und Dopamin im Blut bei gleichzeitiger Reduktion und häufigerer Fragmentierung der Schlafzeit. Darauf folgte eine Reduktion der Monoamine und gleichzeitigen Verbesserung der Schlafqualität (SHOUSE et al., 2001). Dies deckt sich auch mit früheren Feststellungen, nach denen die anfallsbedingten Schlafstörungen nur von transienter Natur waren und noch am selben Tag wieder zurückgehen konnten (CALVO & FERNANDEZ-MAS, 1994).

### **3.2. Modelle mit selbst-erhaltendem Status epilepticus**

Bei diesem Modell für chronische Epilepsie führt eine chemische oder elektrische Stimulation des Hippocampus zu einem SE. Nach dessen Abklingen und einer Latenzzeit von etwa zwei bis vier Wochen kommt es durch Alterationen der Netzwerke auf Zell- und molekularer Ebene zu spontan auftretenden Anfällen (LOSCHER, 2002; LOSCHER, 2011; POTSCHKA, 2013).

Vor der Etablierung standardisierter chemischer SSSE-Modelle verwendete man Formulierungen verschiedener Metalle wie zum Beispiel Aluminium-(III)-Oxid (Alumina-Creme) (GASTAUT et al.,

1959a) oder Eisen-Salze (WILLMORE et al., 1978).

Schon früh injizierten Gastaut et. al. Alumina-Creme in die Amygdala gesunder Katzen. Als Folge beobachteten sie einen fokalen SE, wonach sich nach etwa 3 Wochen spontan auftretende psychomotorische epileptische Anfälle entwickelten. Histologisch zeigten sich die damals schon beim Menschen bekannten, für TLE-Patienten typischen, Anzeichen der HS mit Gliose sowie Nervenzellverlust in CA1 und CA4 (GASTAUT et al., 1959a).

Zehn Jahre später fanden Schwartz und Kollegen bei einem ähnlichen Versuch, der sich jedoch des Penicillins als Auslösers bediente, allerdings keinen Effekt auf die Integrität des Hippokampusgewebes (SCHWARTZ et al., 1970).

Die bis dahin verwendeten Chemikalien erbrachten keine verlässlichen Ergebnisse und produzierten nur kurz anhaltende epileptische Foci (LEITE et al., 1990) und wurden daher ersetzt.

### **3.2.1. SSSE durch Pilokarpin**

Bei Pilokarpin handelt es sich durch seine Analogie zum Acetylcholin um ein potentes direktes Parasympathomimetikum. Nach systemischer Anwendung entwickeln die behandelten Tiere motorische Anfälle, die sich über ein bis zwei Stunden schließlich zum SE entwickeln (LEITE et al., 1990).

Der Einsatz von Pilokarpin zur Erzeugung limbischer Anfälle wurde erstmals 1983 erwähnt. Nachdem das Mittel intraperitoneal an Ratten verabreicht wurde, wurden zunächst motorische Anfälle und folgend ein limbischer SE festgestellt. Diese Anfälle erzeugten weitreichende Schäden verschiedener Gehirnregionen wie dem olfaktorischen Kortex, der Amygdala, Thalamus, Neocortex, Hippocampus und Substantia nigra (TURSKI et al., 1983).

Auch infolge subkutaner Injektion des Pilokarpins konnten die typischen Folgen beobachtet werden; zunächst traten Zuckungen der Gesichtsmuskulatur, Ataxie und Kopfzittern auf. Nach etwa 20 Minuten

entwickelten sich dann motorische limbische Anfälle, die alle zwei bis acht Minuten wiederkehrten und schließlich nach etwa einer Stunde in einem SE gipfelten. Die Mortalitätsrate der Tiere lag zu diesem Zeitpunkt bei etwa 30%. Nach einer Latenzphase von durchschnittlich 15 Tagen entwickelten sich etwa zwei- bis dreimal wöchentlich spontan auftretende Anfälle (TURSKI et al., 1983; LEITE et al., 1990).

Aufgrund fehlender Remission und sehr regelmäßigem Auftreten limbischer Anfälle, eignet sich dieses Modell gut, um die Mechanismen partieller Anfälle mit Ursprung im Temporallappen zu untersuchen (LEITE et al., 1990).

Auch die histologischen Veränderungen der Hippocampi der mit Pilocarpin behandelten Ratten zeigten mit MFS, Verlust von Interneuronen und GCD, Ähnlichkeit zu denen von TLE betroffener Menschen. Allerdings sind die sonstigen Schäden des Gehirns noch viel weitreichender als bei TLE. Die Möglichkeiten zur Erforschung neuer Therapien dürften an diesem Modell jedoch beschränkt sein, da die Tiere schwer zu handhaben sind und unter Stress häufig mit zusätzlichen Anfällen reagieren (CURIA et al., 2008).

### **3.2.2. SSSE durch Kainsäure**

#### **3.2.2.1. SSSE durch Kainsäure bei Labornagern**

Ein weiterer Stoff, der sich zur Auslösung von spontanen Anfällen nach SSSE eignet, ist Kainsäure (KA). Bei KA handelt es sich um ein zyklisches Analogon zu L-Glutamat (JOHNSTON et al., 1974). Als Agonist zu diesem exzitatorischen Neurotransmitter ist es ebenfalls geeignet, Anfälle auszulösen.

Das erste Mal als potentiell Modell für TLE wurde SSSE durch KA im Jahr 1977 vorgestellt. Hier wurde die Chemikalie intraventrikulär bei Ratten angewendet. Die Tiere zeigten limbische Anfälle mit Zittern, Klonus der Gliedmaßen und Schaum vor dem Maul. Besonders die histopathologischen Veränderungen des Hippocampus zeigten eine starke Ähnlichkeit zu denen der HS beim Menschen: mit steigender



Dosis der KA wurden zunächst die Zellen des CA3-Segments, dann die des CA4 und schließlich des CA1-Segmentes zerstört. Der CA2-Sektor war erst bei letalen KA-Dosen betroffen (NADLER et al., 1978).

Nachdem zunächst nur die akute Phase des KA-SSSE-Modells beachtet wurde, berichteten Cavalheiro et al. von den Langzeiteffekten der durch KA induzierten Anfälle (CAVALHEIRO et al., 1982). Sie unterteilten den Verlauf in eine akute und eine chronische Phase.

Direkt nach der intrahippokampalen Applikation der KA zuckten die Barthaare der Ratten und gelegentlich kam es zu Kotabsatz. Nach Ende der für die Injektion nötigen Narkose zeigten die Tiere automatisierte Bewegungen der Applikationsseite, die sich nach drei bis fünf Stunden zu limbischen Anfällen, vergleichbar mit denen eines vollgekindelten Tieres, entwickelten. Die chronische Phase unterteilte sich in eine Latenzphase von bis zu 21 Tagen, eine Phase mit SRS, die etwa ein- bis zweimal pro Tag auftraten und eine anfallsfreie Phase, die sich nach etwa 30 Tagen entwickelte und außer geringem Spiking der Amygdala mit keinerlei weiteren Veränderungen einherging (CAVALHEIRO et al., 1982).

#### **3.2.2.2. SSSE durch Kainsäure bei Hund und Katze**

Über die Anwendung dieser Technik wurde auch bei Katzen und bei Hunden berichtet. Bei Katzen wurde Anfang der achtziger Jahre ein Modell zur intrahippokampalen KA-Injektion im wachen Zustand entwickelt. Hierzu wurde die KA erst etwa 14 Tage nach der Implantation der Injektionskanülen appliziert. Das Anfallsmuster war mit dem bei Ratten beobachteten vergleichbar: es entwickelte sich zunächst ein fokaler SE über zwei bis drei Tage, dem dann nach einer Latenzzeit von etwa 30 Tagen zwei bis drei SRS pro Woche folgten. Histologisch zeigte sich je nach Dosierung der KA ein Nervenzellverlust in CA1 und CA3 über zusätzlich CA4 bis hin zu einem kompletten Untergang der Pyramidenzellen (TANAKA et al., 1982; TANAKA et al., 1985).

Bei Hunden entwickelten sich nach einer Injektion von KA in die Amygdala ebenfalls temporale Anfälle nach dem bei den anderen Spezies beschriebenen Muster. Bezüglich der Hippokampuspathologie widersprechen sich die Daten. Während eine Studie keine HS-ähnlichen Veränderungen fand (HASEGAWA et al., 2002), berichtet eine andere von komplett ausgebildetem, bilateralen Nervenzellverlust im Pyramidenzellband ab 48 Stunden nach der KA-Injektion (HASEGAWA et al., 2003).

### **3.2.3. SSSE durch elektrische Stimulation**

Da die chemokonvulsiven SSSE-Modelle eventuell durch neurotoxische Effekte überlagert sein konnten, entwickelten Vicedomini und Nadler an Ratten ein SSSE-Modell, das durch rein elektrische Stimulation erreicht wurde.

Hierzu wurde eine bipolare Elektrode in den Fasciculus angularis oder die Fimbria sowie eine Aufzeichnungselektrode in das CA3-Segment implantiert. Nach etwa zwei Wochen der Erholung wurden jeweils zehn sekundige Stimulations-Zyklen angewendet, bis mindestens 15 Minuten selbsterhaltende Anfallsaktivität erzielt wurde. Langzeituntersuchungen wurden hier jedoch nicht angestellt. Die Schäden, die diese Anfälle hervorriefen, ähnelten denen der chemokonvulsiven Modelle und betrafen den Hippocampus, Amygdala, Thalamus, Entorhinalen, Piriformen und Neocortex. Außerdem wurde festgestellt, dass der Grad der Schädigung mit der Dauer des SE zusammenhing (VICEDOMINI & NADLER, 1987)

## **4. Klinische Studien zur Epilepsie bei Katzen**

### **4.1. Demographische Daten**

Auch wenn in letzter Zeit verschiedene Studien publiziert wurden, ist die Datenlage zur Epilepsie bei Katzen deutlich schlechter als bei Hunden. Im Folgenden werden die Daten der wenigen größeren demographischen Studien zusammengefasst.

Es konnte keine Geschlechtsprädisposition für Epilepsie bei Katzen festgestellt werden. Im Durchschnitt sind die Tiere beim Auftreten der Anfälle zwischen vier und sieben Jahren alt (BARNES et al., 2004; SCHRIEFL et al., 2008; PAKOZDY et al., 2010; WAHLE et al., 2014).

Bezüglich des Anfallsmusters dominierten generalisierte Anfälle, gefolgt von fokalen Anfällen deren Inzidenz um die 20% liegt (BARNES et al., 2004; PAKOZDY et al., 2010; PAKOZDY et al., 2013a).

Die Ätiologie der Anfälle unterschied sich je nach Studie. Jedoch lässt sich sagen, dass intrakranielle Neoplasien - insbesondere Meningeome (KLINE, 1998; SCHRIEFL et al., 2008; PAKOZDY et al., 2010) und inflammatorische Gehirnerkrankungen (SCHRIEFL et al., 2008) - die häufigste Ursache für Anfälle zu sein scheinen.

Des Weiteren wurde immer wieder von Epilepsie unbekannter Ursache (EUC) gesprochen. Dies wurde bei jenen Tieren diagnostiziert, bei denen keine andere zugrundeliegende Pathologie festgestellt werden konnte. Je nach Studie wird von 25% (SCHRIEFL et al., 2008) bis 47% (WAHLE et al., 2014) betroffenen Tieren berichtet.

Insbesondere systematisch erhobene gehirnpathologische Daten fehlen bisher völlig. Durch die Versuche im Tiermodell ist bereits bekannt, dass Katzen unter experimentellen Bedingungen HS-ähnliche Veränderungen im Hippocampus entwickeln können. Immer wieder wurden auch ähnliche Veränderungen in einzelnen klinischen Fallberichten dokumentiert. Auch in den größeren Katzen-Epilepsiestudien wurde von einzelnen Fällen mit Zellverlust in verschiedenen CA-Segmenten berichtet (SCHRIEFL et al., 2008)

#### **4.2. Limbische Enzephalitis und Hippokampusnekrose**

Eine besondere Entität der Katzenepilepsie stellt der Komplex aus limbischer Enzephalitis (LE) und Hippokampusnekrose (HN) (LEHN) dar.

In der ersten ausführlichen Beschreibung dieser Krankheit aus dem Jahr 2000 wurden 38 Katzen mit sehr ähnlichen Symptomen untersucht und die Daten systemisch aufgearbeitet (FATZER et al., 2000).

Die Tiere zeigten, zusätzlich zu epileptischen Anfällen, alle ähnliche klinische Symptome. Sie verhielten sich unruhig, erregt oder aggressiv, speichelten vermehrt, hatten beidseitige Mydriasis sowie eingetrübtes Bewusstsein.

Die Anfälle zeigten sich zu Beginn oft als einfache fokale Anfälle, die plötzlich auftraten und sich rasch bis zur Generalisierung und zum SE verschlechterten. Die Anfälle konnten sich hierbei generalisiert tonisch-klonisch oder als Cluster fokaler Anfälle manifestieren. Oft wurden Zuckungen der Schnurrhaare, Ohren und Gesichtsmuskulatur beobachtet.

Die Sektion der Tiere ergab bis auf die neuropathologischen Befunde keine weiteren Besonderheiten. Makroskopisch fiel bei den Gehirnen auf, dass der Bereich des Hippocampus hell und weich-bröckelig erschien. In der histologischen Untersuchung zeigten sich Verluste der Pyramidenzellen des Hippocampus und teilweise auch der Körnerzellen des DG. Die Nervenzellen waren geschrumpft, hypereosinophil und zeigten teilweise Karyolyse. Bei längerem Überleben fanden sich im Hippocampus kaum noch Nervenzellen und stattdessen eine ausgeprägte fibrilläre Astroglie. Der Hippocampus konnte zusätzlich mit Lymphozyten und Mikroglia infiltriert sein, außerdem zeigten die Kapillaren im betroffenen Gebiet Wandproliferation.

Da alle untersuchten Katzen aus demselben geographischen Raum (Bern und Umgebung) stammten und die Veränderungen so uniform waren, vermuteten die Autoren eine toxische Genese der Erkrankung (FATZER et al., 2000).

Vier Jahre später folgte aus Italien ein Fallbericht über zwei Katzen mit genau denselben Symptomen wie von Fatzer et al. beschrieben. Die Tiere zeigten ebenfalls progressiv schlimmer werdende fokale Anfälle mit Zuckungen der Gesichtsmuskulatur und Verhaltensauffälligkeiten. Auch die histologischen Veränderungen spiegelten die Befunde der Schweizer Katzen fast identisch wider. Folglich entkräfteten die Autoren, dass es sich bei der HN der Katze um eine toxische oder umgebungsassoziierte Genese handle (BRINI et al., 2004).

In einer weiteren Studie aus der Schweiz wurden einige Jahre später zusätzlich die MRT-Befunde von Katzen untersucht, die an LEHN litten. Klinisch zeigte sich erneut das mittlerweile bekannte und sehr eindeutige Bild progressiver Anfälle mit fazialer Komponente und Verhaltensänderungen. Bei der Untersuchung im MRT zeigten alle Tiere eine beidseitige gut abgegrenzte hippokampale Hyperintensität in der T2-Gewichtung, während sich das Gewebe in der T1-Gewichtung hypointens darstellte. Die Kontrastaufnahme variierte. Zwischen diesen Befunden und den Befunden der histopathologischen Untersuchung des Hippocampus konnte ein klarer Zusammenhang hergestellt werden (SCHMIED et al., 2008).

Im Jahr 2011 berichtete eine Studie erneut von Katzen mit komplexpartiellen Anfällen mit orofazialer Komponente. Wie vorher, bestätigte sich die Einheitlichkeit des klinischen Bildes. Die typischen histologischen Veränderungen der HN wurden bei elf von 17 Tieren festgestellt. Außerdem fand man bei sechs der untersuchten Katzen die von Schmied et al. beschriebenen Anzeichen für LEHN auf MRT-Aufnahmen. Wurde bisher vermutet, dass LEHN eine akute und tödliche Krankheit aufgrund der schweren Anfälle darstellt, wurde hier von vier überlebenden Tieren berichtet. Die Autoren schlussfolgerten, dass LEHN nicht zwingend zum Tod der Katze führen musste, wenn schnell eine aggressive und intensive Therapie eingeleitet wurde. Nach einer Zeit unter Behandlung mit Phenobarbital und Gabapentin legten sich die Anfälle und verschwanden bei zwei Tieren sogar völlig (PAKOZDY et al., 2011).

Erst zwei Jahre später fand man im Serum von etwa 35% der

untersuchten Katzen mit orofazialen Anfällen, Autoantikörper gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle (VGKC). Dies wies erstmals konkret auf eine mögliche Ätiologie der LEHN hin. Unterstützt wurde diese Feststellung von der Tatsache, dass die Tiere auf eine Behandlung mit Immunsuppressiva positiv ansprachen (PAKOZDY et al., 2013b).

*Für eine Zusammenfassung der bisherigen Berichte über Hippokampuspathologie bei Katzen, siehe auch Tabelle 1.*

**Tabelle 1** fasst die bisher bekannten Befunde der Hippokampuspathologie bei Katzen zusammen.

<b>Autor</b>	<b>Fallzahlen</b>	<b>Klinische Befunde</b>	<b>Histopathologische Befunde</b>
FATZER et al. 2000	38 Katzen	Generalisierte oder komplex-partielle Anfälle mit Tendenz zur Progression zum SE	Veränderungen auf den Hippocampus und den Lobus piriformis begrenzt. Geschrumpfte, hypereosinophile Neurone im Pyramidenzellband mit pyknotischen Kernen. Extensive Mikro- und Astroglie sowie teilweise endotheliale Gefäßproliferation und gelegentliche Infiltration des Parenchyms mit Lymphozyten
BRINI et al. 2004	2 Katzen	Unruhe, Umherlaufen, Aggression, Zuckungen der Gesichtsmuskulatur und der Schnurrhaare, Kaubewegungen	Im Pyramidenzellband Neuronenverlust und -nekrose mit hypereosinophilem Zytoplasma und geschrumpften Kernen. Fibrilläre oder hypertrophische Astroglie.
SCHMIED et al. 2008	4 Katzen	Akut auftretende generalisierte Anfälle begleitet von Aggression, Speicheln und Desorientiertheit	Schwere bilateral diffuse Nekrose des Hippocampus und Lobus pyriformis mit stark eosinophilem Zytoplasma und pyknotischen Kernen. Teilweise Infiltration mit Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen
SCHRIEFL et al. 2008	91 Katzen	Zwei der einundneunzig Tiere zeigten akut auftretende generalisierte Anfälle	Nekrose des Hippocampus und Lobus piriformis mit Astroglie und Sklerose assoziiert.
PAKOZDY et al. 2011	17 Katzen	Komplex-partielle orofaziale Anfälle mit Kaubewegungen, Speicheln, Zucken der Gesichtsmuskeln und Wesensveränderung	Bei elf der siebzehn Katzen bilaterale Degeneration oder Verlust der Pyramidenzellen im Hippocampus. Starke Mikroglie in allen Fällen, teilweise perivaskuläre Lymphozyten und Astroglie.

Obwohl schon vor vielen Jahren in experimentellen Studien auf die Ähnlichkeit der hippokampalen Veränderungen epileptischer Katzen zur HS des Menschen hingewiesen wurde, und auch die klinischen Anzeichen denen der humanen TLE oft ähneln, wurden Gehirne epileptischer Katzen bisher nie systematisch auf solche Anzeichen untersucht.

Auch eine genauere Unterscheidung der LE und HN als eine mögliche Vorstufe oder Ursache von HS bei Katzen rückte bisher nicht in den Fokus.

Fände man neben der klinischen Symptome auch auf zellebene weitere Ähnlichkeiten zwischen der TLE des Menschen und an Epilepsie erkrankten Katzen, wäre dies vielleicht die Möglichkeit, an einer natürlich entstehenden HS bessere Einsichten in die zeitliche Entwicklung und den Verlauf dieser Krankheit zu bekommen. Denn neben aller offensichtlichen Vorteile eines HS-Modells an Labornagern, muss doch bedacht werden, dass die Veränderungen im Gehirn durch die verwendeten epileptogenen Agenzien verzerrt oder überlagert werden könnten (SLOVITER & BUMANGLAG, 2013).



### III. TEILSTUDIE 1

#### Hippocampal Sclerosis in Feline Epilepsy

Eva Wagner<sup>1</sup>; Marco Rosati<sup>1</sup>; Jessica Molin<sup>1</sup>; Ulrike Foitzik<sup>1</sup>; Andrea M. Wahle<sup>2</sup>; Andrea Fischer<sup>2</sup>; Lara A. Matiassek<sup>2</sup>; Sven Reese<sup>3</sup>; Thomas Flegel<sup>4</sup>; Kaspar Matiassek<sup>1</sup>

1 Section of Clinical & Comparative Neuropathology, Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine

2 Section of Neurology, Small Animal Medical Clinic, Centre for Clinical Veterinary Medicine

3 Institute of Veterinary Anatomy, Department of Veterinary Sciences, Ludwig Maximilians University of Munich, Munich

4 Neurology Service, Department of Small Animal Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

*Parts of this Work were presented at the 26<sup>th</sup> Annual Symposium of ESVN and ECVN, Paris 2013*

*and*

*Second International Workshop of Veterinary Neurosciences, Hannover 2014, this presentation was awarded with the Young Scientist Award for best presentation*

Submitted to Brain Pathology © International Society of Neuropathology

Received 15 October 2013, Accepted 31 March 2014

Published Online 3 April 2014

doi:10.1111/bpa.12147

**ABSTRACT**

Hippocampal sclerosis (HS) refers to loss of hippocampal neurons and astrogliosis. In temporal lobe epilepsy (TLE), HS is a key factor for pharmacoresistance, even though the mechanisms are not quite understood. While experimental TLE models are available, there is lack of models reflecting the natural HS development. Among domestic animals, cats may present with TLE-like seizures in natural and experimental settings. With this study on the prevalence, segmental pattern and clinicopathological correlates of feline HS, we evaluated the translational value for human research. Evaluation schemes for human brains were applied to epileptic cats. The loss of neurons was morphometrically assessed and the degree of gliosis was recorded. Hippocampal changes resembling human HS were seen in about one third of epileptic cats. Most of these were associated with infiltrative diseases such as limbic encephalitis. Irrespective of the etiology and semiology of seizures, total hippocampal sclerosis was the most prevalent form seen in epileptic animals. Other HS types also occur at varying frequencies. Segmental differences to human HS can be explained by species-specific synaptic connectivities and a different spectrum of etiologies. All these variables require consideration when translating results from feline studies regarding seizure-associated changes of the temporal lobe and especially HS.

## INTRODUCTION

Hippocampal sclerosis (HS) is a major concern in progressive and therapy-resistant epileptic disorders in humans (42). The term refers to the combination of neuronal loss in the pyramidal cell band of the hippocampus and reactive astrogliosis (11). The earliest description of HS dates back as far as 1825, which also was the first notification of hippocampal pathology in epileptic patients in general (13). The regional vulnerability to excitotoxic damage has been documented manifold ever since. However, the hippocampal contribution to epileptogenesis and disease progression still is far from being understood. Instead, the hippocampus has been considered being a target of convergent tissue changes in the course of seizures, as much as it may serve as primary epileptogenic zone (18).

Post-mortem investigations in human patients affected by various epileptic syndromes identified the anterior part of the human hippocampus as the region that shows the most extensive degenerative changes in terms of HS when being examined along its longitudinal axis (45). This hippocampal head belongs to the temporal lobe and may explain the specific association of therapy resistance in temporal lobe epilepsy (TLE) and HS, which accounts for 10% of all human epilepsy cases (41). Compliant with the concept of HS providing an anatomical base of epileptogenesis, TLE patients represent nearly 70% of all epilepsy patients subjected to tailored brain resection (41) and 80% of TLE patients benefit from seizure freedom for at least 2 years post surgery (9).

With regard to the understanding of the pathobiology of TLE and elaboration of tissue-sparing strategies, animal models of human TLE are indispensable. Even though highly standardized kindling (16) and chemoconvulsant (14) models are available, a natural disease model, reflecting the spontaneous development of HS, would be a valuable addendum for translational studies. Recent papers already highlight the feasibility of canine epilepsy as large animal model for human research (32). The authors state a “striking similarity in aetiology, clinical manifestation and disease course in between epileptic humans and dogs” (32). With regard to TLE, the dog model, however, does not appear to

reflect the human situation sufficiently (15, 17).

Cats with limbic seizures with or without orofacial involvement may help to overcome this gap, as they appear to have epilepsy of temporal lobe origin (24, 29, 31, 49). Hence, research may benefit from comparative studies in this domestic animal that is broadly available through neurological veterinary practices. Moreover, epileptic cats of various seizure types also may exhibit resistance to antiepileptic drugs (AED), which may offer another relevant focus of research. As to whether this may be caused by anatomical changes or nonspecific multidrug resistance requires further investigations.

As a first step toward the evaluation of the feasibility of a feline epilepsy model for comparative research in temporal lobe epilepsy, in general, and HS, in particular, we assessed the hippocampal and extrahippocampal pathology in a cohort of cats suffering from various seizure types and etiologies. We addressed in particular the prevalence and segmental pattern of HS with regard to the subtypes reported in humans (9, 11). Thereby, we obtained the relative risk (RR) of HS development sorted for signalment, semiology and nosology.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Case selection**

This study enrolled cats with epilepsies of different origins. The definitions of epilepsy and seizures were used in accordance with those proposed to and by the International League Against Epilepsy (ILAE) (5, 6, 22). Medical records and pathology reports from cats submitted to the neuropathology laboratory, between 1997 and 2011, were retrieved from the archives.

Cats with a documented history of recurrent seizures and/or status epilepticus (SE) were included if they underwent postmortem examination and if they had a full clinical workup consisting of a detailed description of out of clinic fits by the owners, documentation of seizure events witnessed by the neurology team, complete neurological examination, treatment and

epicrisis, results from blood analyses and, possibly, magnetic imaging studies and cerebrospinal fluid (CSF) analyses. The group of epileptic cats was compared with an age- and sex-matched control group.

### **Medical record analysis**

Medical records were studied with regard to the signalment and the clinical presentation. Major determinants were, in particular, the reliability of seizure diagnosis, the time course and semiology of seizures, possible treatment schemes, the laboratory workup and the absence/presence of concurrent disorders.

Regarding seizure classification, focal seizures were defined as unilaterally involving parts of the body and occurring with or without loss of consciousness. Generalized seizures were defined as seizures involving the entire body accompanied by loss of consciousness. If generalized seizures developed out of primarily focal seizures, they were termed secondary generalized seizures. The term status epilepticus referred to generalized seizures sustained for longer than 5 minutes or cluster seizures without recovering consciousness between seizures. The event was defined as primary SE, if it occurred without any prior seizures, while secondary SE was defined as being preceded by seizures of any type.

### **Tissue sampling and processing**

All brains were fixed through immersion in 10% neutral-buffered formalin for at least 3 days before external inspection and trimming as described earlier (19). For the standardized hippocampal examination, the brains were cut transversely at the level of the temporo-ventral body of the hippocampus. This candidate area was chosen as it resembles the feline counterpart to the human mesial temporal lobe, namely, the center of the hippocampal head (33), which is the region most commonly affected by HS in humans (45), and because of its frequent involvement in feline seizures (29). Moreover, sampling can be easily reproduced by independent investigators and all segments of the cornu ammonis (CA1 through CA4 (26)) and dentate gyrus can be reliably identified in subsequent histological specimens.

The bihemispheric brain slides passed an ascending ethanol series and xylene treatment in an automatic tissue processor. Upon paraplast® (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) embedding, sections were taken at 5 µm slice thickness and stained with hematoxylin and eosin for histopathological examination. Further stains were elected case-based, depending on the character of a particular lesion. These included Nissl's cresyl violet, luxol fast blue, periodic acid Schiff and immunohistochemical staining for feline infective agents (feline corona virus, feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus, borna disease virus, *Toxoplasma gondii*) or specific cell markers (glial fibrillary acidic protein, S-100, CD3, CD20, CD79a, lysozyme, vimentin).

### **Neuropathological examination**

Standard algorithms were applied for general assessment of brain pathologies. Histological investigation was carried out using a Zeiss Axiophot® (Zeiss, Jena, Germany) equipped with a CCD camera (Leica) with optic magnification ranging from ×5 to ×1000.

Specific examination of the hippocampus was carried out in agreement with a modified classification system for mesial temporal sclerosis and granule cell pathology (GCP) in humans (9). Histological evaluation was accomplished by quantitative assessment of neuronal density within CA-subfields 1 through 4 and the straight inner and external limbs of the dentate gyrus (DG) using digital image analysis of non-overlapping photomicrographs via modified Delaunay's triangulation plug-in for Fiji image® (open source platform; <http://fiji.sc/Fiji>) processing package (Version 1.47i). Conclusions on neuronal density were drawn from the surrogate parameter interneurononuclear distance (INND). Distances were therefore calculated between the geometrical centers of neighboring nerve cell nuclei. In the DG, measurements were accomplished by obtainment of the mean diameter of the granule cell band from three areas of the limbs.

### **Identification of HS**

In agreement with consensus statements (9, 10), we defined HS as a significant dropout of pyramidal cells from any segment of the hippocampal cell band (CA1 through CA4) in combination with reactive

astroglial proliferation. Changes to the neuronal density were calculated from the segmental INND (see above) while GFAP immunohistochemistry was launched to facilitate detection of astroglial changes. An INND increase exceeding twice the standard deviation ( $2 \times \text{SD}$ ) of the INND of the non-neurological control population was considered abnormal. Mean values between  $2 \times \text{SD}$  and fourfold standard deviation ( $4 \times \text{SD}$ ) were graded as mildly increased. A moderate INND increase was defined as values between  $4 \times \text{SD}$  and sixfold standard deviation ( $6 \times \text{SD}$ ). INND exceeding  $6 \times \text{SD}$  was considered as a severe deviation (9) (see Figure 1).

### Data analyses

All measurements per subfield were transferred into Excel® spreadsheets. Statistical analyses were conducted and illustrated using PAST® ([http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)) and GraphPad Prism® (STATCON, Witzenhausen, Germany) statistic softwares. Group and subgroup characteristics were summarized as univariate analysis. Shapiro–Wilk algorithms gave way for parametric discriminative and correlation analyses. Thereby, single comparisons were carried out via Student's *t*-test while multiple comparisons employed analysis of variance (ANOVA) with Tukey's *post hoc* modification. Correlation analyses were based on Spearman's rank sum test for nonparametric assays and Pearson's test for parametric studies. Categorical parameters were evaluated via chi square or Fisher's exact test that also assisted with the obtainment of the relative HS risk. Data analysis was accomplished by calculation of the confidence interval ( $\text{CI}_{95}$ ). *P*-values  $\leq 0.05$  were accepted as indicating significance.

## RESULTS

### Demographics, semiology and clinical course

One hundred eleven cats were included in the study. Ninety-three of these had a history of seizures (Table 1), while the remaining 18 animals resembled non-epileptic controls.

Corresponding to regional breed preferences, European shorthair cats were overrepresented in the epileptic group (83/93), followed by 4 Persian cats, 2 British shorthair and 1 Burmese, Birman, Siamese and Charteux each. In none of the cases, the owners/breeders indicated a litter or pedigree-related neurological problem. The mean age of epileptic cats was  $8.0 \pm 5.7$  years. Concerning gender distribution, 59.1% ( $CI_{95}$  48.5–69.2) of the cats were females, 40.9% ( $CI_{95}$  30.8–51.5) were males.

Twenty-two cats (22/93) had a history of status epilepticus (SE). In 10 animals, (10/22) the SE resulted from an aggravation of generalized seizures (secondary SE). The other 12 cats were presented to the practitioner or clinic because of SE without antecedent seizure events (primary SE). In eighteen (18/22) cases, SE resulted in early sudden death or euthanasia. Eight SE cats died during a seizure event. The other 10 animals were euthanized because of incomplete recovery (3/10), poor prognosis (3/10) or lack of owner's compliance (4/10). Only four animals with secondary SE survived more than 3 weeks after disease onset.

Within the non-SE group, 51 animals (54.8%,  $CI_{95}$  44.2–65.2) had primarily generalized seizures. Ten cats (10.7%,  $CI_{95}$  5.3–18.9) were admitted because of focal seizures. Two out of these (2/10) were affected by simple focal seizures without loss of consciousness, four (4/10) had complex focal seizures with loss of consciousness and another four (4/10) presented with secondary generalized seizures. A typical TLE-like seizure pattern with orofacial manifestation had been observed in seven of the animals presenting with focal seizures (7/10). In the remaining 10 animals (10/71), the clinical records did not reliably allow for classification of the seizure episodes, apart from an exclusion of SE.

With reference to the time course of seizure events, 17 of the non-SE



cases had their first seizure earlier than 3 weeks prior to the post-mortem examination (range 3 months to 3 years). The other 54 cats had their first seizures less than 3 weeks prior to death. Six of the 71 non-SE cases died during a seizure event and 18 cats died unobserved by the owners. In none of these, other causes of death were identified on post-mortem examination or by revision of clinical data. In the remaining 47 cases, the owners elected euthanasia.

Medication records revealed antiepileptic treatment in 27 cats. Twelve of those received benzodiazepines with (4/12) or without a loading dose of phenobarbital (8/12) just a few hours prior to death. Four animals died under emergency treatment. In the other eight, the procedure did not immediately abolish seizure activity. Hence, the owners declined further therapies. Nine animals (9/27) died (2/9) or were euthanized (7/9) for the same reason while receiving acute treatment with phenobarbital. In another 6/27 cats, treated with phenobarbital for periods between 3 weeks and 3 years, seizures were not sufficiently suppressed (3/6) or recurred (3/6), thereby, leading to the overall decision for euthanasia.

### **Seizure nosology**

Systematic brain inspection did not reveal specific pathologies (other than HS) in 24 of 93 epileptic cats (25.8%, CI<sub>95</sub> 16.0–35.5; Table 1). Lack of evidence from clinical, imaging and laboratory records is prerequisite for clinically defined epilepsy of unknown cause (EUC) (3, 36, 50). In this study, the absence of unequivocally primary brain lesions in combination with lacking clinical and laboratory indications of seizure origin was referred to as epilepsy of unclear etiology. The remaining 69 cats (74.2%, CI<sub>95</sub> 62.9–81.8) presented with structural forebrain lesions — independent of HS — that were epileptogenic or that, respectively, reflected systemic disturbances with an epileptogenic potential.

Among these structural epilepsies, inflammatory conditions comprised the largest group (36/70). An infectious etiology was identified in 12 of these cases, resembling the CNS variant of feline infectious peritonitis (4/36), bacterial infections (4/36), migrating nematodes (2/36), *T. gondii* (1/36) and one undetermined protozoal encephalitis (1/36). In two other cases

(2/36), the infiltration pattern and cytopathic features suggested a viral origin. In nine of the 36 brains with inflammatory lesions, the changes were consistent with the feline limbic-encephalitis-hippocampal-necrosis-complex (LEHN) (29, 30). In the remaining 13/36 cats, clinical and pathological data did not allow for identification of the underlying trigger or target of inflammation. Independent of the spatial characteristics, the inflammatory brain diseases were not statistically linked to a certain type or course of seizures.

Vascular and vasogenic abnormalities were seen in 20 epileptic cats (28.6%, CI<sub>95</sub> 13.5–30.9). Among these, eight cats showed hypertensive lesions, one of which also exhibited hyaline microthrombi (shock bodies) throughout the microvessels of the forebrain. Other vasogenic/vascular features comprised three cases with multiple ischemic forebrain infarcts (3/20), another three cases with parenchymal hemorrhage of undetermined etiology (3/20), and two cats each presenting with subtotal middle cerebral artery thrombosis (2/20), necrotizing vasculitis (2/20) and lymphocytic vasculitis (2/20).

The third largest group of epileptic animals (16/70) exhibited intracranial neoplasia (14/16), a choroid plexus cyst (1/16) or diffuse bihemispheric enlargement (1/16). Thereby, focal compression and/or shifting of the forebrain were seen in five cases with WHO grade I meningioma, one pituitary macroadenoma and the choroid plexus cyst.

Seven tumors (three secondary lymphomas, two primary CNS lymphomas, one undifferentiated round cell sarcoma, one meningeal sarcoma) caused disruption of the brain tissue because of parenchymal invasion. Another case presented with angioinvasive features caused by CNS manifestation of vasotropic lymphoma.

In 11 (11/70) cases, the brain tissue reflected metabolic-toxic or degenerative conditions. One case was consistent with thiamine deficiency and two with uremic encephalopathy. In the remaining cats, it proved impossible to identify a specific etiology. One animal, however, presented with abundant Alzheimer type II cells without clinical or pathological evidence of liver disease. A group of five cats showed a

uniform symmetric spongy encephalopathy indicative of a hitherto unreported neurodegenerative disorder.

Of the animals with structural epilepsy, 56 cats were affected by one single type of disease. In the remaining 13 cases, multiple modalities were encountered. Notably, in all but one of these cases (12/13), a vascular or vasogenic pathology was involved (Figure 2).

### **Pyramidal cell density, hippocampal sclerosis and mode of nerve cell decay**

Univariate interneurononuclear distance values from the individual CA segments in control and epileptic cats are depicted in Table 2.

In control cats, the mean INND was 41.9  $\mu\text{m}$  in CA1, 42.1  $\mu\text{m}$  in CA2, 50.1  $\mu\text{m}$  in CA3 and 89.1  $\mu\text{m}$  CA4. The INND of CA1, CA2 and CA3 correlated positively to each other ( $P \leq 6.6 \cdot 10^{-6}$ ;  $r = 0.55$  to  $0.7$ ), whereas the neuronal density of CA4 appeared to be independent to those of the other segments ( $P \geq 0.3$ ). In the control group, only two values exceeded  $2 \times \text{SD}$ : one in the CA1 segment and another one in the CA4 segment. Correlation analysis revealed a significant ( $P \leq 0.03$ ,  $r = 0.38$  to  $0.45$ ) impact of the age on the INND throughout CA1 to CA3 (Figure 3). No such interdependence was seen in the end-folium and hilus (CA4;  $P = 0.24$ ;  $r = 0.22$ ).

In epileptic cats, the mean INND was 47.9  $\mu\text{m}$  in CA1, 48.4  $\mu\text{m}$  in CA2, 56.7  $\mu\text{m}$  in CA3 and 106.8  $\mu\text{m}$  CA4. An age dependency was not evident ( $P \geq 0.87$ ;  $r = -0.04$  to  $0.04$ ; Figure 3). However, 52 epileptic cats exceeded the INND reference range of control animals and categorical testing obtained a significant reduction of cellular density compared with non-epileptics. Significant neuronal loss was identified in 19.5% of the CA1 segments, 18.5% of CA2 segments, 23.2% of CA3 segments and 17.4% of CA4 segments (Table 3). Thereby, a significant correlation was seen between the same CA segments of both hemispheres ( $P \geq 0.027$ ;  $r = 0.3$  to  $0.8$ ). This association was independent of the topography of a possible extrahippocampal lesion.

In contrast to the age-associated neuronal loss seen in the control group,

pyramidal cell decay in epileptic animals significantly correlated to and segregated with astrogliosis ( $P \leq 0.0001$ ;  $r = 0.38$ ) (Figure 3) leading to a positive HS diagnosis of an INND exceeding the  $SD \times 2$  accompanied by any degree of astrogliosis in at least one segment of the pyramidal cell band in 31 of 52 cats with INND deviation. Bihemispheric investigation identified bilateral HS in 10/31 and unilateral lesions in 21/31 (equaling 41 HS hippocampi in total). The pattern was bilaterally symmetrical in 4/10 hippocampi. The segments with mild increase in INND were affected by concurrent fibrillary astrogliosis in 50.5% of cases. The segments with moderate INND increase were associated with gliosis in 61.1% and finally the ones with severe nerve cell loss showed significant gliosis in 90.9% of cases (Figure 4).

Statistical testing revealed a significantly larger INND within the HS group compared with the general seizure cohort and control animals throughout all CA segments ( $P \leq 2.2 \times 10^{-5}$ ).

Actual nerve cell necroses, in far most cases, resembled excitotoxic phenotypes (pink neurons). In 2/9 LEHN cats and one case of viral encephalitis, lymphocytic attack and neuronophagia was widespread throughout all CA segments and the dentate gyrus, whereas two remaining LEHN cats showed isolated neuronophagic lesions in CA1, CA2 and CA3 (Figure 5). The latter and animals suffering from attenuated limbic encephalitis without neuronophagia showed occasional clusters and isolated neurons undergoing eosinophilic necroses. Highly active LEHN cases presented with massive neuronal necroses within and outside of infiltrated areas (Figure 5).

### **Segmental characteristics of HS and INND in epileptic cats**

Of the four CA segments, the CA3 region was most frequently involved comprising 26 out of 41 HS-bearing hemispheres, followed by CA4 (22/41), CA1 and CA2 (20/41 and 18/41 respectively). Monosegmental HS was identified in 17 out of 41 hemispheres. Thereby, involvement of CA3 and CA4 was almost twice as frequent as that of CA1 and CA2 (5/17 and 6/17 vs. 3/17 for CA1 and CA2). The remaining 24 cases presented with polysegmental HS. All CA segments were affected in seven hemispheres.

Among the remaining cases, the combinations CA3 + 4 and CA1 + 2 + 3 predominated with five hemispheres each. Other combinations (Figure 6) were seen in individual cases only. The only combinations missing were CA2 + 4 and CA1 + 3 + 4. A further insight into association of seizure type and nosology with INND in cats with and without HS is provided in Table 1.

### **Impact of seizure course, semiology and antiepileptic treatment on INND and HS**

In the HS group, the known duration of seizure disease was longer than in the remaining epilepsy group. Thus, 29% (CI<sub>95</sub> 14.2–48) of animals had a disease course lasting more than 3 weeks, compared with only 21% (CI<sub>95</sub> 14.6–32.4) of all animals with seizures. Risk analysis obtained a 1.4 times higher RR of developing HS for animals with longer seizure disease, than for animals with shorter seizure histories.

Compared with both the persistent focal seizure cases and the primary generalized seizure group, focal-onset seizures with secondary generalization showed a significantly higher INND throughout all segments ( $P \leq 0.008$ ). Further testing of generalized seizures against SE showed that primary SE cases did not behave significantly different ( $P \geq 0.4$ ). Comparison between primary SE and secondary SE, rendered significant differences for CA1, in that INND ( $P = 0.05$ ) was significantly higher in secondary SE. Animals presenting with secondary SE furthermore were at a 2.4 times higher risk of developing HS, than with any other seizure type ( $P = 0.014$ ). Cats affected by focal seizures, in contrast, had a RR of only 0.5. The INND scatter-plots sorted for the seizure types are depicted in Figure 7.

Prior to euthanasia, all cats with bilateral HS presented with generalized seizures or SE. The history of one single animal with bilateral HS revealed complex focal seizures at previous presentations. All other cats with bilateral HS were affected by primary or secondary SE prior to the final presentation.

Among the epilepsy group, cats submitted with a concise history of anticonvulsive treatment had a very high INND in CA2 ( $P = 0.005$ ) and

CA3 ( $P = 0.005$ ). No significant differences were seen between the emergency treatments and acute or chronic medication schedules ( $P \geq 0.41$ ).

### **Association of INND and HS with type of brain pathology**

Concerning the individual disease categories (Figure 8), significant reduction of nerve cell densities were detected throughout all CA segments in the inflammatory disease group ( $P \leq 7.2 \times 10^{-5}$ ) and the group of combined pathologies ( $P \leq 0.03$ ). Intracranial mass lesion showed differences in all sectors but CA1 ( $P$  (CA1) = 0.08,  $P$  (other segments)  $\leq 0.02$ ).

Vascular encephalopathies and epilepsies of unclear etiology were not associated with a significant increase in INND if compared with non-epileptic controls. The risk of HS was found to be highest for inflammatory diseases with a RR of 2.1 ( $P = 0.02$ ). While the animals with epilepsy of unclear etiology, metabolic and vascular encephalopathies both had a RR below 0.3 ( $P = 0.02$ ). The cats affected by intracranial masses only had a slightly elevated risk for HS compared with latter groups (RR 1.3;  $P = 0.7$ ).

### **Segregation vs. dissociation, and laterality of HS and concurrent brain pathologies**

In 79 hemispheres, structural lesions were extrahippocampal and noncontiguous to the hippocampus and parahippocampus. These extrahippocampal lesions were associated with ipsilateral HS in eight hemispheres and with contralateral HS in one case.

In 49 hemispheres, the hippocampus itself was affected by possibly epileptogenic structural lesions. These all were parenchymal neoplastic (12.5%) or inflammatory (87.5%) cell infiltrates. In 25 of these hippocampi (51.0%), the pathology was consistent with HS.

On direct comparison, the INND of affected hippocampi ( $72.1 \mu\text{m} \pm 14.45$ ) and those ipsilateral to a lesion ( $62.9 \mu\text{m} \pm 17.7$ ) were significantly higher than the INND of the control group throughout all segments ( $P \leq 0.04$ ). No significant difference ( $P \geq 0.16$ ) was detected between the corresponding ipsilateral and contralateral hippocampal segments in epileptic cats.

Animals with hippocampal lesions showed a 6.9 times elevated RR with regard to HS ( $P < 0.0001$ ).

Notably, all 10 animals affected by bilateral HS suffered from segregating infiltrative disorders, namely, one angiocentric B cell lymphoma and nine inflammatory pathologies.

### **Comparative temporal characteristics of seizure history and structural brain lesions**

Special attention was directed at the match-mismatch of seizure history and the age/stage of an epileptogenic lesion. In general, there was a high degree of congruence. As expected on the basis of the disease development and progression, neoplastic diseases had a rather short seizure history (mean: 8.6 days), whereas in metabolic and degenerative disorders, the onset of seizures dated further back (mean: 103.2 days). In LEHN, the time courses were explicitly variable, ranging from a few days only to several years.

Notably, across all etiologies, the time course was neither predictive for the neuronal density nor for the occurrence of HS. Hence, a significantly increased INND was also seen in very acute courses with one fatal primary SE or even primary generalized seizures dating back a few hours. Similarly, the time span from seizure onset to death in HS cats ranged from 1 day to over 3 years.

### **Granule cell dispersion in HS**

On quantitative assessment, granule cell band thickness was significantly increased in epileptic cats with HS as compared with those without HS and those spared from seizures ( $P \leq 2.72 \times 10^{-5}$ ). INND and DG morphology were consistent with GC dispersion in 14.6% of HS-affected epileptics while only 0.6% epileptic animals of the non-HS group showed this subtype of GCP type II. No such changes were seen in the single HS case of the nonepileptic group. Notably, 7/14 cats with TLE presented with HS plus GC dispersion.

## DISCUSSION

Early chemoconvulsant kindling models in cats have brought some insight on epilepsy-related hippocampal pathology in this species (24, 37–39, 49). Less information has been gathered from natural cases, which is surprising, concerning the prevalence of feline epilepsy in neurological practice, the unique occurrence of TLE among domestic animals and the anecdotal evidence of HS. Even though HS proved to contribute to progression and therapy resistance of epilepsy in people (11), the occurrence and possible impact of HS on the clinical course of feline seizures has not yet been explored.

With this first study dedicated to the prevalence and pattern of HS in cats, we found ILAE-conforming HS subtypes in one-third of a non-selected population of epileptic cats suffering from various types of seizures.

According to observations made in humans, three different onsets of HS are to be distinguished. Most commonly, HS develops as a consequence of ongoing seizure activity with or without initiating precipitating injury (known as secondary HS) (7, 47, 51). Alternatively, primary or idiopathic HS appears to coincide with the onset of seizures, which is particularly evident in human TLE (7, 47, 51). Another HS variant can be seen in non-epileptic human patients admitted caused by cognitive dysfunction, often associated with Alzheimer's disease (52).

Compared with non-epileptogenic HS that rarely goes with dentate gyrus pathology (46), about 50% of human TLE patients present with granule cell dispersion (8). Corresponding dentate gyrus changes were evident in 14.6% of the HS-affected feline epileptics of this study, containing TLE and non-TLE type of seizures. Concerning TLE cats only, granule cell dispersion also affected 50% of the animals while a total of 64.3% of TLE cats presented with HS.

Non-epileptogenic HS cannot be excluded on scientific grounds in the remaining cats. On the other hand, feline HS was restricted to epileptic animals with exception of one single control cat being unilaterally affected by mild monosegmental HS. The remaining HS cases all were seen in epilepsy cases. Even though age is a major determinant of neuronal cell



density in the feline hippocampus, this association was lost in epileptic cats and therefore did not influence the grade of confirmed HS. Other associative factors are hitherto unknown in cats and require specific exploration. A distinction of primary vs. secondary HS could essentially benefit from surgical samples and prospective studies, including serial magnetic resonance imaging (MRI).

Most human studies on the pattern and epileptogenic role of HS have been conducted on surgical samples obtained from patients suffering from long-standing, therapy-resistant TLE (9, 43) while only a few studies document HS in non-epileptic patients and in epilepsies of extra-temporal and extra(para)hippocampal origin (45). This preselection renders particular HS types and "HS-only" pathologies more prevalent, than in the non-selected cat population. With an increased awareness of feline HS, future studies may improve the comparative value for human research prospectively by entity-based selection criteria involving multiple referral centers.

This feline post-mortem study, on the other hand, allowed for the evaluation of a plethora of seizure nosologies and the association with hippocampal vs. extrahippocampal structural pathologies. Downside of the diagnostic yield and resolution, the data obtained here require careful consideration of a selection bias. Most demographic and epidemiologic data obtained match the findings of previous studies (3, 31, 36) such as the 25.8% EUC cases (3, 36, 50). Yet, it has to be taken into account that in a post-mortem setting, benign courses are underrepresented. In the same vein, animals affected by focal seizures resembled 10.7% of the investigated collective only. In feline neurological practice, they range up to about 52% of clinical presentations (36). With an expected loss of further mildly affected animals of an outhouse population, because of lack of owners' compliance regarding autopsy and non-detection of focal seizures, the caseload of this study is dominated by severe clinical presentations.

With 23.7% of feline HS cases being associated with epileptogenic extrahippocampal forebrain lesions, the causal relationship between HS and the concurrent pathology was further investigated. Brains with

extrahippocampal lesions were sorted for etiological categories and compared within and across these groups. Not surprisingly, the vast majority of feline HS (76.3%) was found with pathologies disrupting the hippocampal architecture. Among these, inflammatory diseases were most prevalent (48.4%) and caused the most severe loss of pyramidal cells across all CA segments, either via local/remote excitotoxic events or via direct autoimmune attack. Lymphocytic invasion and neuronophagia indeed were most prominent in the feline analogon of human limbic encephalitis (21, 29, 35). Limbic encephalitis has been reported to account for up to 50% of HS-positive human TLE cases (7). Among our post-mortem cohort, we only identified nine LEHN cats, which may be caused by the benign character of this disorder (29) and by the difficulty to identify non-infiltrative stages histologically.

Now, that serological tests have been established for the voltage gated potassium channel (VGKC)-subtype in cats, intravital diagnosis will facilitate comparative research on limbic encephalitis (30) while other paraneoplastic epileptic syndromes surely will flag-up soon (1).

Apart from LEHN, HS was also seen in bacterial, parasitic and viral encephalitis involving the hippocampus. In loco production of proinflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$  (2) and interleukin-6 as (20) well as shedding of bacterial lipopolysaccharides and parasitic toxins (34) cause damage to the blood–brain barrier (27) and may decrease the depolarization threshold in exposed neurons (48). Hence, disruptive and chemical changes of the microenvironment as well as specific cytotoxic actions all may contribute to the extensive histopathological sequelae triggering secondary HS. Only slightly less powerful, intractable seizures and HS were evoked by neoplasms with locally destructive growth.

It is noteworthy that all feline cases of bilateral HS were caused by either neoplastic or inflammatory infiltrates invading both hippocampi even though the lesions were symmetrical in only 40% of affected animals. This observation may be of predictive value for cats diagnosed with bilateral HS via MRI. All other entities lead to a unilateral HS, which also resembles the predominant manifestation of primary and secondary HS in humans (28, 47, 52).

HS contralateral to a structural brain lesion is extremely rare and in our cats just affected animals with hippocampal pathologies (on the non-HS side). In particular, HS with ipsilateral lesions may be explained by changes to neuronal circuits, vascular supply or focal effects on the seizing neurons. Unilateral HS with systemic disturbances such as metabolic disease still remains unclear. On the other hand, thorough revision of the slides revealed subsclerotic hippocampal changes in more than 50% of cases, which presented as either solitary INND increase or as pure astrogliosis.

Only three cats presented with unilateral “HS-only pathology” compatible with idiopathic HS (7, 47, 51). As to whether HS resembles a perpetuating trigger of feline epilepsy remains to be elucidated via EEG mapping and lobectomy/lobotomy studies.

Concerning the clinical presentation, a clear ranking could be identified for the extent of neuronal loss: focal seizures were associated with least damage followed by primary SE, primary generalized seizures, secondary SE and, finally, focal seizures that progressed into generalized seizures had the worst impact on hippocampal cell density. Hence, seizures that progress into more severe clinical presentations also have advanced tissue changes. In human TLE, a similar scene set has been described. People with progression from focal to generalized seizures tend to have reduced hippocampal volumes on MRI when compared with those with focal seizures (40). In addition, there is a positive association between the occurrence of secondary generalizing tonic clonic seizures in TLE and the manifestation of HS (12).

In human TLE, the pattern of hippocampal affection is divided into four groups: (i) the most common classic HS, affecting mainly CA1 and CA4; (ii) the total or severe HS, affecting all segments to a similar degree; and (iii) the less CA1-predominant; and (iv) end-folium sclerosis, affecting only the CA4 subfield (9). Apart from being anatomically different, the segmental pattern of HS appears to influence the degree of cognitive impairment (4) and postsurgical outcome as CA1-predominant HS patients tend to have a less favorable prognosis and patients with end-folium sclerosis have a better postsurgical performance (44).

Even though all human HS types are represented in the epileptic cats of this study, the most common pattern is consistent with the severe or total HS phenotype (29.2%) that affects between 24% (44) and 53% (9) of human TLE patients only, depending on the respective study design.

Notably, polysegmental HS in cats was seen in 80% of hippocampal brain lesions and in a minority of extrahippocampal lesions. Most of extrahippocampal pathologies and incidental HS affected individual segments without systematic involvement of certain zones.

Concerning the individual segments, CA3 and CA4 were most commonly affected in feline patients, being involved in 63.4% and 53.6% of all HS cases. In contrast to humans (9–11), CA2 does not appear to be spared from nerve cell decay and gliosis as much as in humans. Moreover, the classic human HS ILAE type I is rarely seen in cats. Hence, CA1 does not represent the most vulnerable part of the feline pyramidal cell band.

Some dissimilarities to the appearance in humans may be explained by the unique situation that in cats, the entorhinal cortex layer III projects into CA2 and CA3, while in other mammalian species, they address the subiculum and CA1 (25). A particular knowledge of the species-specific neuronal circuits is mandatory for the correct interpretation and translational considerations.

Lacking longitudinal monitoring tools, in this retrospective study, we could not make concise conclusions about the development of HS over time. Seizure onset of our epileptic cats with HS, ranged back between 1 day and more than 3 years. It remains unclear, whether HS may have been present already in a subconvulsive state, or if seizures had gone unrecognized by the owners or were lasting longer than the clinical data suggested. Also, in humans, it has not been sufficiently elucidated when and how exactly HS is supposed to be kicked off. This is due to the fact that in TLE patients, surgery is performed only if seizure control with conservative therapy fails and the seizures have an extremely negative impact on life quality. Only a few studies report on acute HS that can occur as early as 3 months after onset of toxically induced seizures (23).

In order to obtain stringent conclusions about the development,

progression, therapeutic options, prognosis, predictive and comparative value of feline HS, an intravital diagnosis of this condition will be necessary. The use of high-resolution MRI for sequential examination of clinical cats could provide information about the epileptogenicity of HS in this species, the spatiotemporal development of the changes and the relationship between HS and treatment response in felids. The proof of principle regarding the role for epileptogenesis and seizure perpetuation by HS requires to be established via tailored hippocampectomy. More data will be required to strengthen specific aspects of this rather preliminary study. Even then, translation of animal data into human neurology requires careful consideration of feline particularities, some of which became apparent already during this pilot investigation.

## REFERENCES

1. Anderson NE, Barber PA (2008) Limbic encephalitis - a review. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* **15**:961-971.
2. Balosso S, Maroso M, Sanchez-Alavez M, Ravizza T, Frasca A, Bartfai T, Vezzani A (2008) A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1beta. *Brain : a journal of neurology* **131**:3256-3265.
3. Barnes HL, Chrisman CL, Mariani CL, Sims M, Alleman AR (2004) Clinical signs, underlying cause, and outcome in cats with seizures: 17 cases (1997-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **225**:1723-1726.
4. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshe SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* **51**:676-685.
5. Berg AT, Scheffer IE (2011) New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. *Epilepsia* **52**:1058-1062.
6. Bien CG, Urbach H, Schramm J, Soeder BM, Becker AJ, Voltz R, Vincent A, Elger CE (2007) Limbic encephalitis as a precipitating event in adult-onset temporal lobe epilepsy. *Neurology* **69**:1236-1244.
7. Blumcke I, Kistner I, Clusmann H, Schramm J, Becker AJ, Elger CE, Bien CG, Merschhemke M, Meencke HJ, Lehmann T, Buchfelder M, Weigel D, Buslei R, Stefan H, Pauli E, Hildebrandt M (2009) Towards a clinico-pathological classification of granule cell dispersion in human mesial temporal lobe epilepsies. *Acta neuropathologica* **117**:535-544.
8. Blumcke I, Pauli E, Clusmann H, Schramm J, Becker A, Elger C, Merschhemke M, Meencke HJ, Lehmann T, von Deimling A,

- Scheiwe C, Zentner J, Volk B, Romstock J, Stefan H, Hildebrandt M (2007) A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta neuropathologica* **113**:235-244.
9. Blumcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, Bernasconi N, Bien CG, Cendes F, Coras R, Cross JH, Jacques TS, Kahane P, Mathern GW, Miyata H, Moshe SL, Oz B, Ozkara C, Perucca E, Sisodiya S, Wiebe S, Spreafico R (2013) International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia* **54**: 1315-29.
10. Blumcke I, Thom M, Wiestler OD (2002) Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* **12**:199-211.
11. Bone B, Fogarasi A, Schulz R, Gyimesi C, Kalmar Z, Kovacs N, Ebner A, Janszky J (2012) Secondarily generalized seizures in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **53**:817-824.
12. Bouchet C, Cazauviel, CA (1825) De l'épilepsie considérée dans ses rapports avec l'aliénation mentale. Recherche sur la nature et le siège de ces deux maladies. *Arch Gen Med*:510 - 542.
13. Buckmaster PS, Dudek FE (1997) Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *The Journal of comparative neurology* **385**:385-404.
14. Buckmaster PS, Smith MO, Buckmaster CL, LeCouteur RA, Dudek FE (2002) Absence of temporal lobe epilepsy pathology in dogs with medically intractable epilepsy. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* **16**:95-99.
15. Cardoso A, Lukyanova EA, Madeira MD, Lukyanov NV (2011) Seizure-induced structural and functional changes in the rat hippocampal formation: comparison between brief seizures and status epilepticus. *Behavioural brain research* **225**:538-546.

16. Chandler K (2006) Canine epilepsy: what can we learn from human seizure disorders? *Veterinary journal (London, England : 1997)* **172**:207-217.
17. de Lanerolle NC, Lee TS (2005) New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & behavior : E&B* **7**:190-203.
18. De Risio L, Brown R, Tennant B, Sparkes A, Matiassek L, de Stefani A, Weissenbock H, Matiassek K (2012) Slowly progressive lymphohistiocytic meningoencephalomyelitis in 21 adult cats presenting with peculiar neurological signs. *J Feline Med Surg* **14**:250-256.
19. De Sarro G, Russo E, Ferreri G, Giuseppe B, Flocco MA, Di Paola ED, De Sarro A (2004) Seizure susceptibility to various convulsant stimuli of knockout interleukin-6 mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **77**:761-766.
20. Fatzer R, Gandini G, Jaggy A, Doherr M, Vandeveld M (2000) Necrosis of hippocampus and piriform lobe in 38 domestic cats with seizures: a retrospective study on clinical and pathologic findings. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* **14**:100-104.
21. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J, Jr. (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* **46**:470-472.
22. Gardner H, Lawn N, Fatovich DM, Archer JS (2009) Acute hippocampal sclerosis following ecstasy ingestion. *Neurology* **73**:567-569.
23. Gastaut H, Naquet R, Meyer A, Cavanagh JB, Beck E (1959) Experimental psychomotor epilepsy in the cat; electro-clinical and anatomo-pathological correlations. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **18**:270-293.
24. Hirama J, Shoumura K, Ichinohe N, You S, Yonekura H (1997) Cornu



- ammonis of the cat: lack of a separate field of CA2. *Journal fur Hirnforschung* **38**:487-493.
25. Lorente de No R (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* **46**:113 - 177.
  26. Marchi N, Angelov L, Masaryk T, Fazio V, Granata T, Hernandez N, Hallene K, Diglaw T, Franic L, Najm I, Janigro D (2007) Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia* **48**:732-742.
  27. Margerison JH, Corsellis JA (1966) Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain : a journal of neurology* **89**:499-530.
  28. Pakozdy A, Gruber A, Kneissl S, Leschnik M, Halasz P, Thalhammer JG (2011) Complex partial cluster seizures in cats with orofacial involvement. *Journal of feline medicine and surgery* **13**:687-693.
  29. Pakozdy A, Halasz P, Klang A, Bauer J, Leschnik M, Tichy A, Thalhammer JG, Lang B, Vincent A (2013) Suspected Limbic Encephalitis and Seizure in Cats Associated with Voltage-Gated Potassium Channel (VGKC) Complex Antibody. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* **27**: 212-4.
  30. Pakozdy A, Leschnik M, Sarchahi AA, Tichy AG, Thalhammer JG (2010) Clinical comparison of primary versus secondary epilepsy in 125 cats. *Journal of feline medicine and surgery* **12**:910-916.
  31. Potschka H, Fischer A, von Ruden EL, Hulsmeyer V, Baumgartner W (2013) Canine epilepsy as a translational model? *Epilepsia* **54**:571-579.
  32. Sasaki M, Tohyama K, Matsunaga S, Nakamura M, Tomizawa N, Inoue T, Ogawa H, Ehara S, Ogawa A (2004) MRI identification of dorsal hippocampus homologue in human brain. *Neuroreport* **15**:2173-2176.

33. Sayyah M, Javad-Pour M, Ghazi-Khansari M (2003) The bacterial endotoxin lipopolysaccharide enhances seizure susceptibility in mice: involvement of proinflammatory factors: nitric oxide and prostaglandins. *Neuroscience* **122**:1073-1080.
34. Schmied O, Scharf G, Hilbe M, Michal U, Tomsa K, Steffen F (2008) Magnetic resonance imaging of feline hippocampal necrosis. *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association* **49**:343-349.
35. Schriebl S, Steinberg TA, Matiasek K, Ossig A, Fenske N, Fischer A (2008) Etiologic classification of seizures, signalment, clinical signs, and outcome in cats with seizure disorders: 91 cases (2000-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **233**:1591-1597.
36. Tanaka S, Tanaka T, Kondo S, Hori T, Fukuda H, Yonemasu Y, Tanaka M, Shindo K (1993) Magnetic resonance imaging in kainic acid-induced limbic seizure status in cats. *Neurologia medico-chirurgica* **33**:285-289.
37. Tanaka T, Fujita T, Yamamoto K, Fukuda H, Yonemasu Y (1993) Experimental seizure-induced brain damage: electrophysiological, metabolic and pathological correlation. *The Japanese journal of psychiatry and neurology* **47**:239-244.
38. Tanaka T, Kaijima M, Daita G, Ohgami S, Yonemasu Y, Riche D (1982) Electroclinical features of kainic acid-induced status epilepticus in freely moving cats. Microinjection into the dorsal hippocampus. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* **54**:288-300.
39. Tasch E, Cendes F, Li LM, Dubeau F, Andermann F, Arnold DL (1999) Neuroimaging evidence of progressive neuronal loss and dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Annals of neurology* **45**:568-576.
40. Tellez-Zenteno JF, Hernandez-Ronquillo L (2012) A review of the

- epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research and treatment* **2012**:630853.
41. Thom M (2009) Hippocampal sclerosis: progress since Sommer. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* **19**:565-572.
42. Thom M, Eriksson S, Martinian L, Caboclo LO, McEvoy AW, Duncan JS, Sisodiya SM (2009) Temporal lobe sclerosis associated with hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: neuropathological features. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **68**:928-938.
43. Thom M, Liagkouras I, Elliot KJ, Martinian L, Harkness W, McEvoy A, Caboclo LO, Sisodiya SM (2010) Reliability of patterns of hippocampal sclerosis as predictors of postsurgical outcome. *Epilepsia* **51**:1801-1808.
44. Thom M, Liagkouras I, Martinian L, Liu J, Catarino CB, Sisodiya SM (2012) Variability of sclerosis along the longitudinal hippocampal axis in epilepsy: A post mortem study. *Epilepsy research* **102**: 45-59.
45. Thom M, Zhou J, Martinian L, Sisodiya S (2005) Quantitative post-mortem study of the hippocampus in chronic epilepsy: seizures do not inevitably cause neuronal loss. *Brain : a journal of neurology* **128**:1344-1357.
46. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ (2011) The role of inflammation in epilepsy. *Nature reviews Neurology* **7**:31-40.
47. Wada JA, Sata M (1974) Generalized convulsive seizures induced by daily electrical stimulation of the amygdala in cats. Correlative electrographic and behavioral features. *Neurology* **24**:565-574.
48. Wahle AM, Brühshwein, A., Matiasek, K., Wagner, E., Putschbach, K., Mueller, R. S., Fischer, A. (2014) Clinical characterization of epilepsy of unknown cause in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **28**: 182-8.
49. Wieser HG (2004) ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe

epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* **45**:695-714.

50. Zarow C, Weiner MW, Ellis WG, Chui HC (2012) Prevalence, laterality, and comorbidity of hippocampal sclerosis in an autopsy sample. *Brain and behavior* **2**:435-442.

## TABLES

**Table 1** Included cases

	HS			Cohort		
	(n)	(%)	CI <sub>95</sub>	(n)	(%)	CI <sub>95</sub>
<b>Animals (total)</b>	31	33.3	23.9 - 43.9	93	100	
<b>Mean age ± SD</b>	8.2 ± 4.9			8.0 ± 5.8		
<b>Sex distribution</b>						
<b>Males</b>	15	48.4	30.2 - 66.9	38	40.9	30.8 - 51.5
<b>Females</b>	16	51.6	33.1 - 69.8	55	59.1	48.5 - 69.2
<b>Seizure type</b>						
<b>Focal</b>	1	3.2	0.08 - 16.7	6	6.5	2.4 - 13.5
<b>Focal + generalised</b>	2	6.4	0.8 - 21.4	4	4.3	1.2 - 10.6
<b>Generalised</b>	13	41.9	24.5 - 60.9	51	54.8	44.2 - 65.2
<b>Secondary SE</b>	7	22.6	9.6 - 41.1	10	10.7	5.3 - 18.9
<b>Primary SE</b>	3	9.7	2.0 - 25.7	12	12.9	6.8 - 21.5
<b>Not defined</b>	5	16.2	5.5 - 33.7	10	10.8	5.3 - 18.9
<b>Seizure aetiology</b>						
<b>IC mass</b>	5	16.1	5.5 - 33.7	12	12.9	6.8 - 21.5
<b>Vascular</b>	1	3.2	0.08 - 16.7	8	8.6	3.8 - 16.2
<b>Metabolic</b>	3	9.7	2.0 - 25.7	8	8.6	3.8 - 16.3
<b>Inflammatory</b>	15	48.4	30.2 - 66.9	28	30.1	21.0 - 40.5
<b>Aetiol. Unknown</b>	3	9.7	2.0 - 25.7	24	25.8	16.0 - 35.5
<b>Combined</b>	4	12.9	3.6 - 29.8	13	14.0	7.7 - 22.7
<b>Time course</b>						
<b>&lt; 3 weeks</b>	22	71.0	52.0 - 85.8	72	77.4	65.6 - 85.4
<b>&gt; 3 weeks</b>	9	29.0	14.2 - 48.0	21	22.6	14.6 - 32.4

Case numbers, percentages and 95% confidence intervals of all epileptic cats are listed in the right column and of the HS-positive cats in the left column. Please note, that for better distinction of the etiological groups, the animals with combined pathologies were listed as a separate entity and excluded from the other groups.

**Table 2** INND obtained from the different CA-segments

		Control- Group	Seizure- Group			Control- Group	Seizure- Group
CA1	Range	28.3 to 52.1	22 to 108.6	CA3	Range	31.1 to 58.7	26.6 to 121.5
	Mean	41.9	47.9		Mean	50.1	56.7
	SD	4.8	10.5		SD	4.7	12.4
		Control- Group	Seizure- Group			Control- Group	Seizure- Group
CA2	Range	26.6 to 52.8	23.5 to 128.0	CA4	Range	37.5 to 139.0	44.2 to 197.5
	Mean	42.1	48.4		Mean	89.1	106.8
	SD	5.4	16.2		SD	18.6	24.2

Values in  $\mu\text{m}$ . SD = standard deviation.

**Table 3.** Animals meeting the reference range of INND and outliers.

<b>CA 1</b>	<b>CONTROL</b>		<b>SEIZURE</b>	
	(n)	(%)	(n)	(%)
RR	31	96,9	153	80,5
Mild	1	3,1	23	12,1
Moderate	0	0,0	9	4,7
Severe	0	0,0	5	2,6
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>100,0</b>	<b>190</b>	<b>100,0</b>

<b>CA 2</b>	<b>CONTROL</b>		<b>SEIZURE</b>	
	(n)	(%)	(n)	(%)
RR	32	100,0	154	81,5
Mild	0	0,0	22	11,6
Moderate	0	0,0	4	2,1
Severe	0	0,0	9	4,8
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>100,0</b>	<b>189</b>	<b>100,0</b>

<b>CA 3</b>	<b>CONTROL</b>		<b>SEIZURE</b>	
	(n)	(%)	(n)	(%)
RR	32	100,0	146	76,8
Mild	0	0,0	32	16,8
Moderate	0	0,0	4	2,1
Severe	0	0,0	8	4,2
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>100,0</b>	<b>190</b>	<b>100,0</b>

<b>CA 4</b>	<b>CONTROL</b>		<b>SEIZURE</b>	
	(n)	(%)	(n)	(%)
RR	30	96,8	153	83,2
Mild	1	3,2	30	16,3
Moderate	0	0,0	1	0,5
Severe	0	0,0	0	0,0
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>100,0</b>	<b>184</b>	<b>100,0</b>

RR = reference range.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** *Segment-specific INND values of the control group and the seizure group. The red lines indicate the cut-off for mild ( $SD \times 2$ ), moderate ( $SD \times 4$ ) and severe ( $SD \times 6$ ) INND increase. Values lying within the defined boundaries are expressed as percentages for both groups, respectively.*

**Figure 2.** *Combined pathologies in epileptic cats.*

**Figure 3.** *A positive correlation between age and INND is seen in control cats, while the interdependence is lost in hippocampi of epileptic cats.*

**Figure 4.** *The left pictures show the physiological (A) and pathological (B) subgross appearance of the temporal hippocampus.*

B features the most common polysegmental HS with losses throughout all CA segments (black arrows) and a few residual pyramidal clusters (white arrows) in CA1. On the right, GFAP-positive astrocytes are shown in the unaffected hilus (C) and this of a cat with severe HS (D).

**Figure 5.** (A) Pyramidal cell degeneration in limbic encephalitis compared to a normal CA segment. (B) Neuronal loss shows morphologic features of excitotoxicity in terms of eosinophilic necrosis (red arrow). The black arrow indicates scanty perivascular inflammation. (C) Note the perineuronal infiltrates (blue frames).

**Figure 6.** *Segmental HS pattern seen in the hippocampi of epileptic cats from both sides.*



The picture in the left corner visualizes the borders of each CA segment.

**Figure 7.** *INND values sorted for the individual seizure type.*

The red rhombi represent the values that were accompanied by reactive astrogliosis and therefore are consistent with HS. Note that clinical seizure types did not predict reduction of neuronal cell density in certain CA segments in cats with or without HS.

Gen = generalized seizures; SSE = secondary status epilepticus; Foc = focal seizures; PSE = primary status epilepticus.

**Figure 8.** *INND values sorted for the etiological category.*

There is no significant interdependence between seizure nosology and the segmental pattern of HS. Red rhombi resemble HS-affected hippocampi.

Comb = combined pathologies; IC mass = intracranial mass effects; Inflam = inflammatory; Met = metabolic/degenerative changes; Vasc = vascular/vasogenic changes.

Figure 1

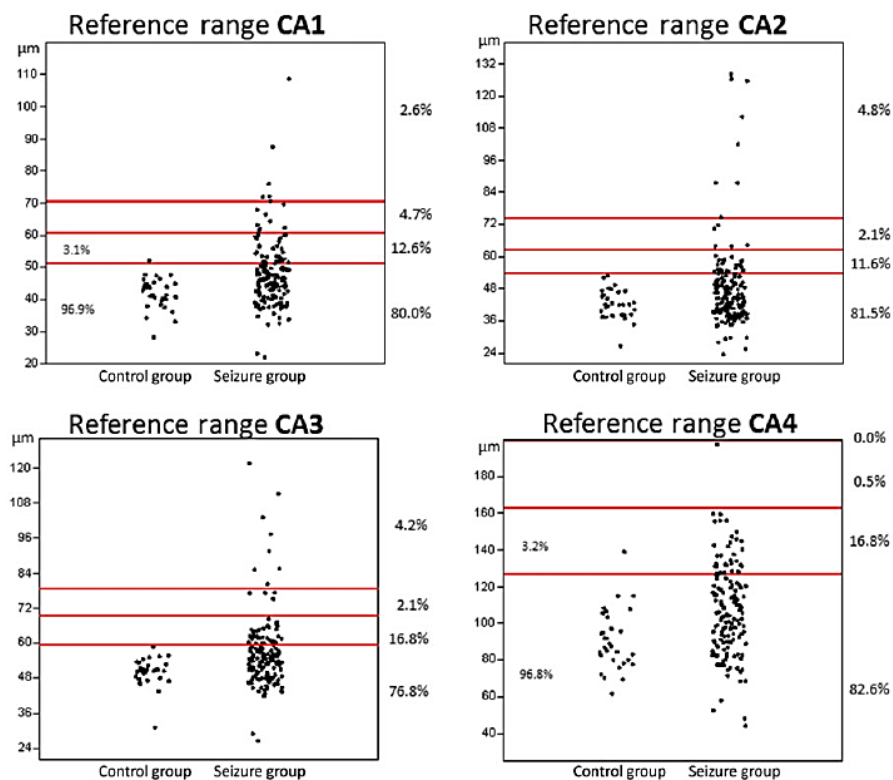


Figure 2

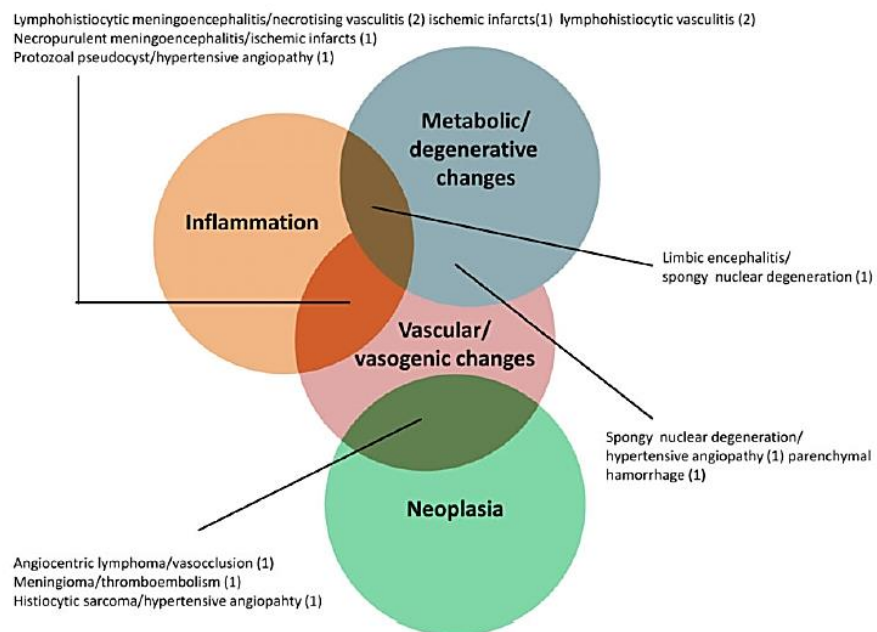
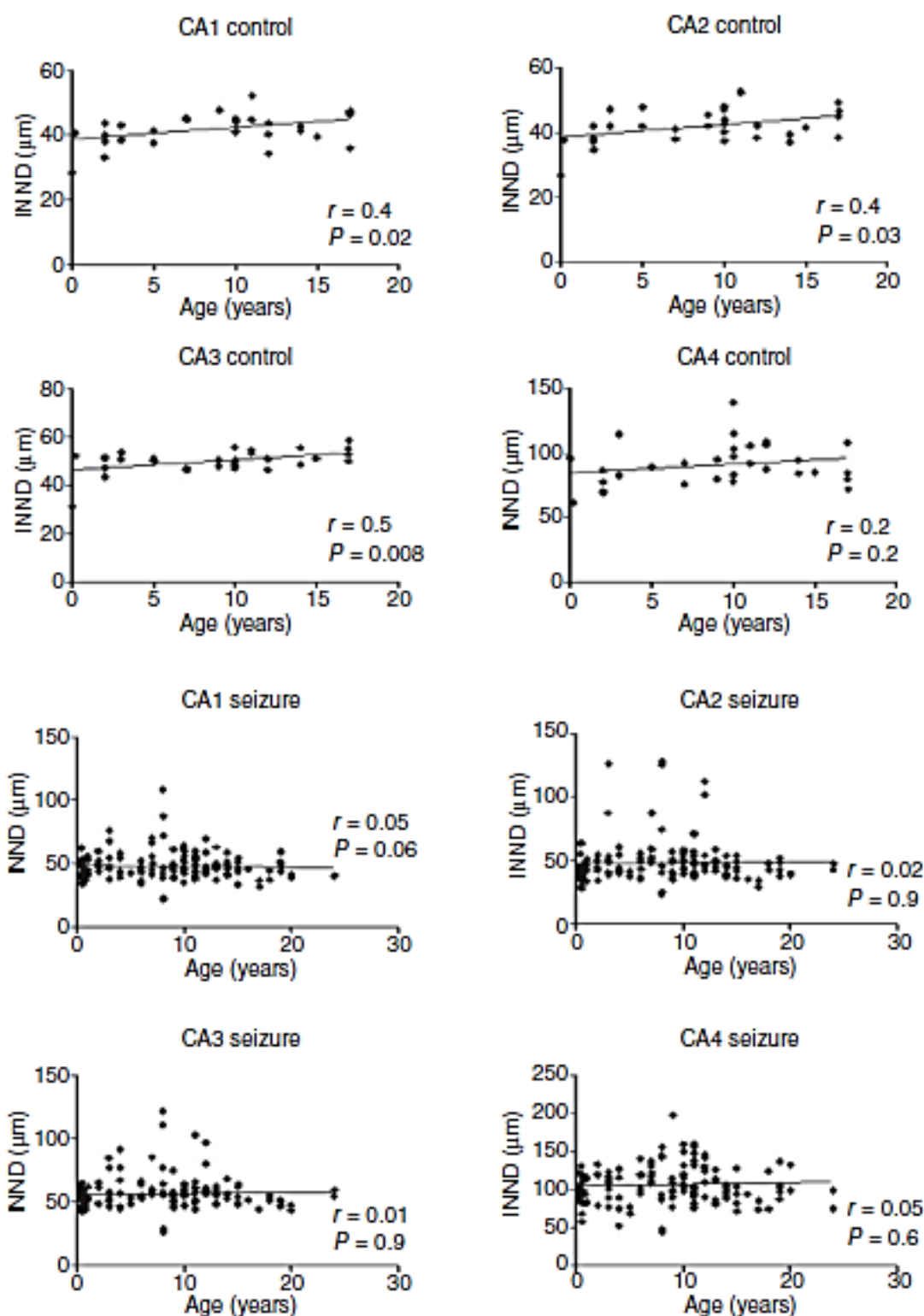


Figure 3



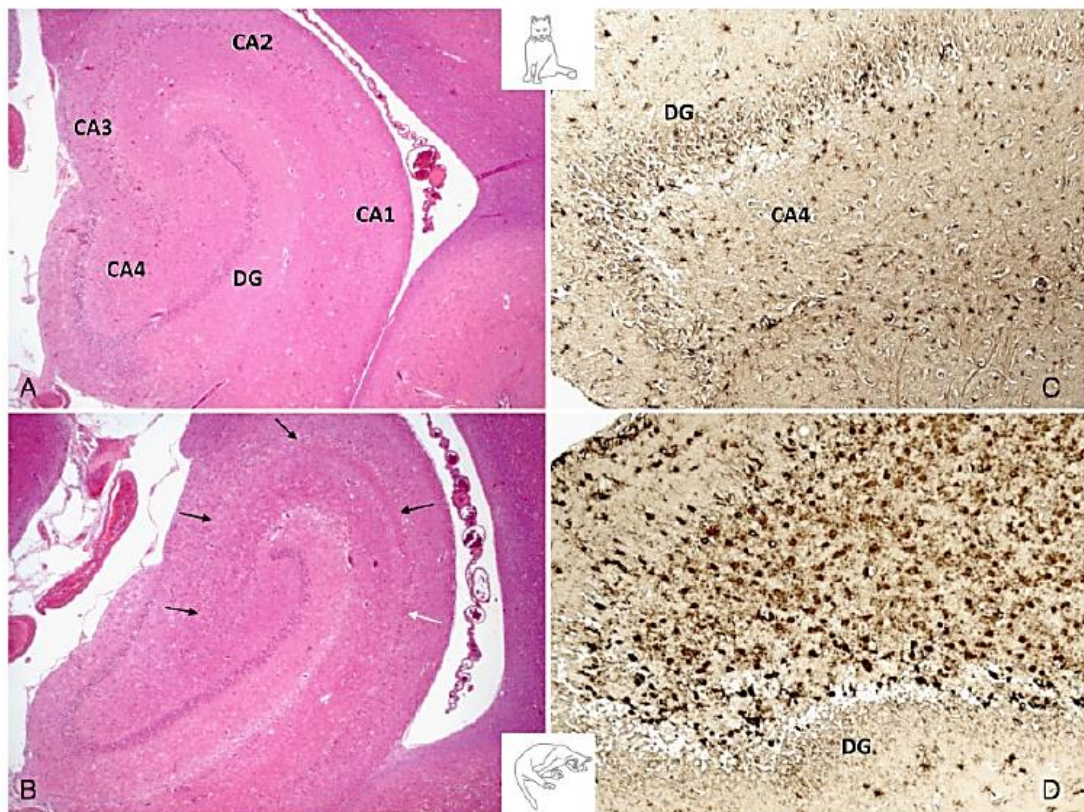
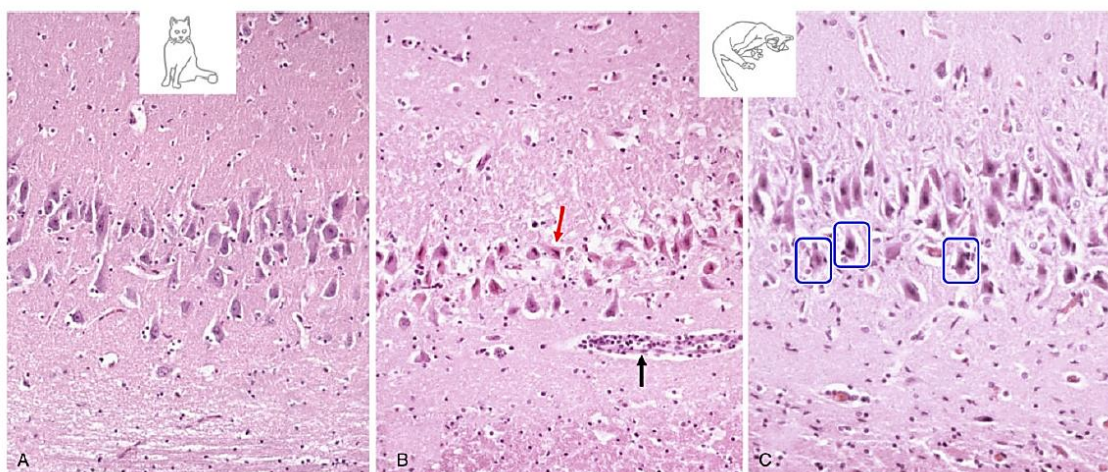
**Figure 4****Figure 5**



Figure 6

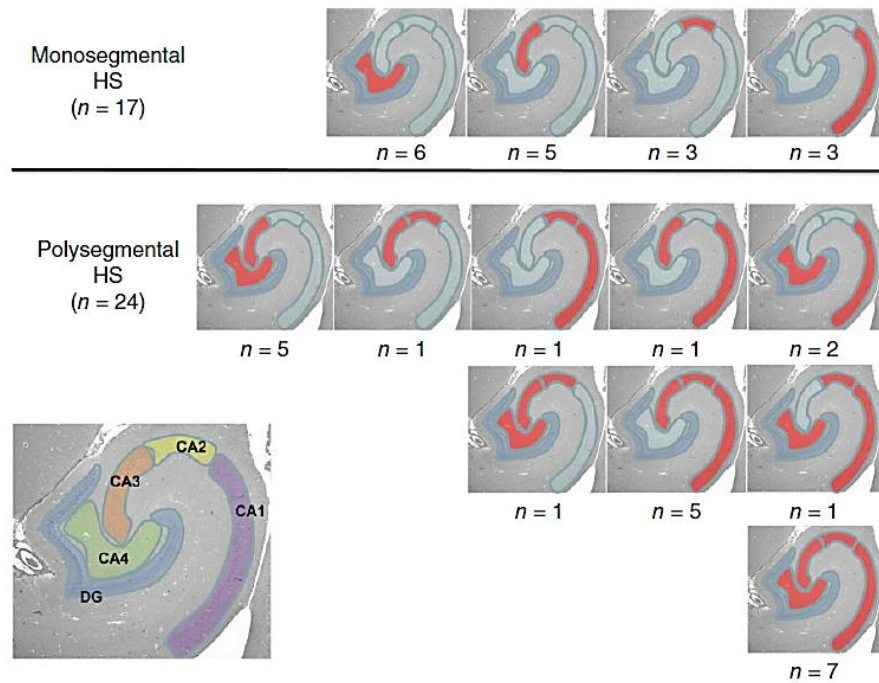


Figure 7

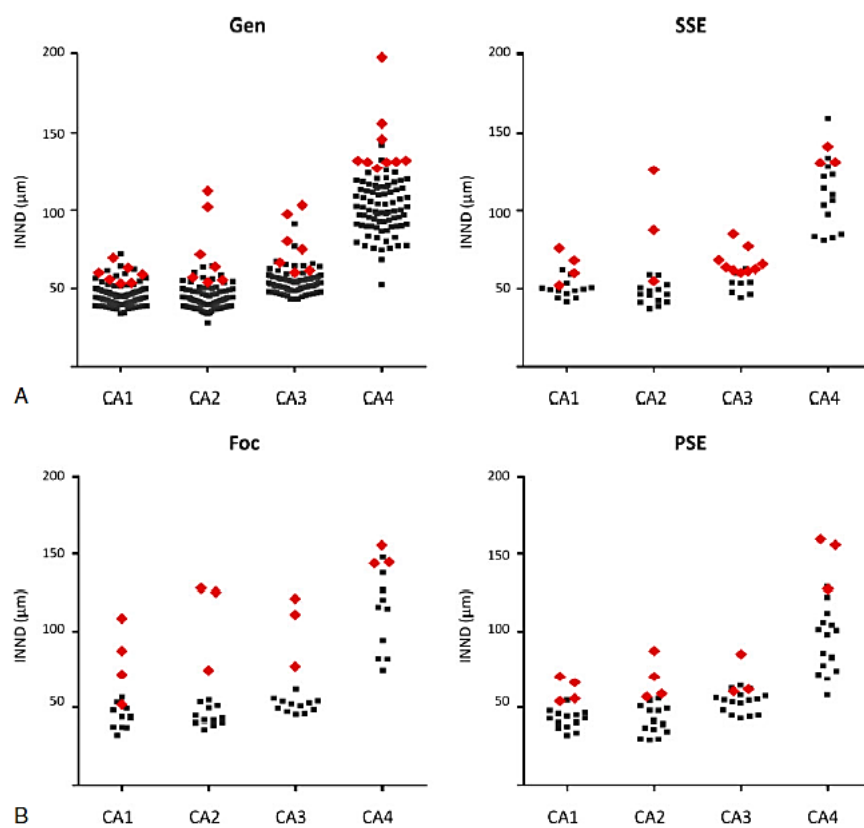
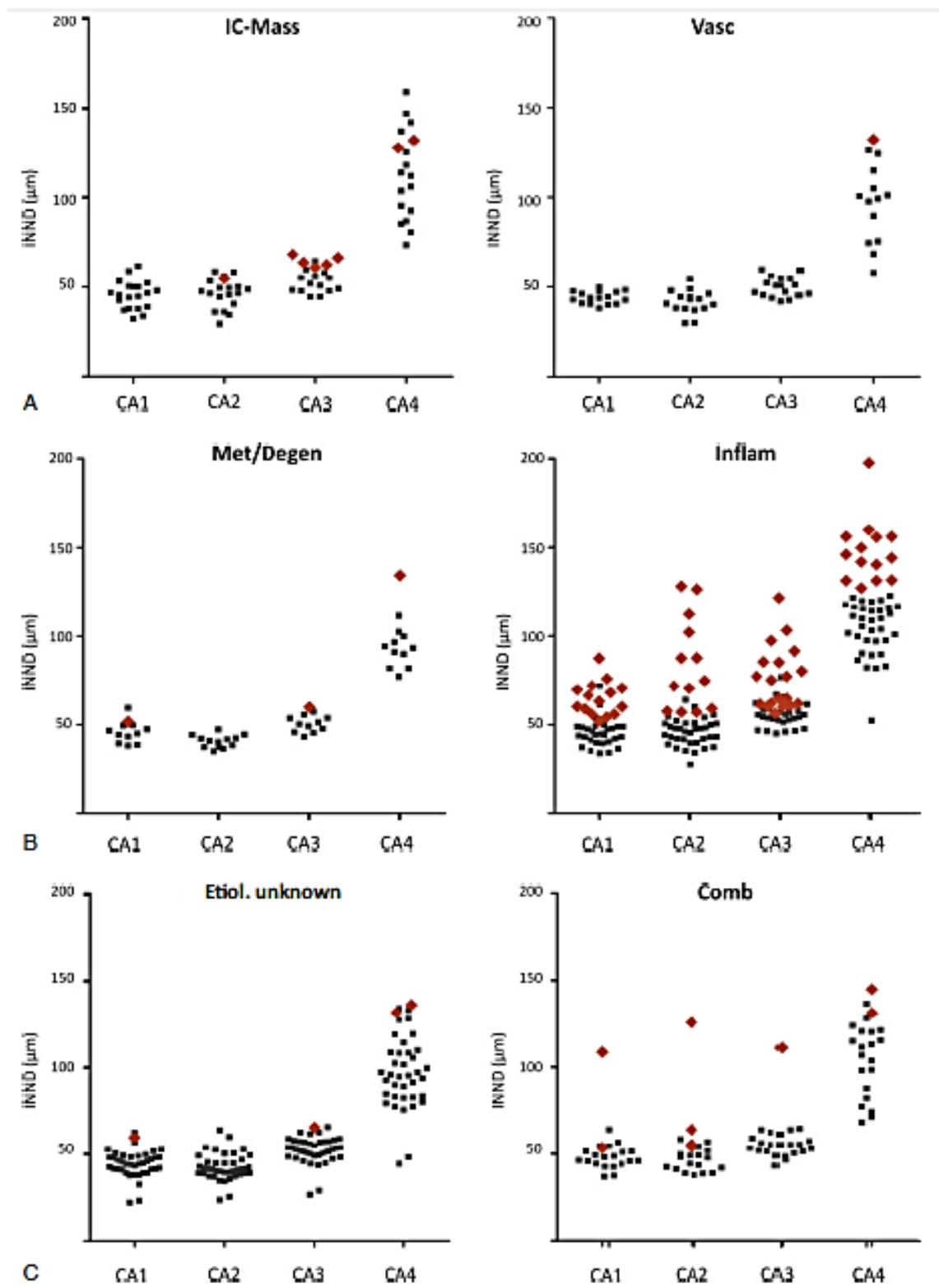


Figure 8



## IV. TEILSTUDIE 2

### Granule cell pathology in feline epilepsy\*

#### Abstract

In epilepsy, some temporal lobe changes, such as hippocampal sclerosis (HS), are associated with therapy-resistance, while dentate gyrus pathology impacts mainly on the cognitive decline.

HS also is frequent in epileptic cats. This study investigated the involvement of granule cell pathology in feline seizures. Hence, epileptic cats with and without HS were investigated for lesions corresponding to human granule cell pathology type 1 and 2 after morphometric obtainment of granule cell density.

With a diameter of  $90.5 \mu\text{m}$  (SD 18.4), dentate gyrus was largest in HS-positive, compared to HS-negative (mean  $72.7 \mu\text{m} \pm 12.7$ ) and controls ( $70.5 \mu\text{m} \pm 8.8$ ). Granule cell pathology was identified in 76.5% of epileptics with HS, 53.4% without, and 24.1% controls. Ectopia of granule cells was most common in both HS-positive and HS-negative cats ( $p \leq 0.005$ ), affecting between 31.5% and 42.9% of patients. Thinning was seen in about 10.9% of non-HS epileptics only.

In summary, granule cell pathology is a common finding in feline epilepsy and in particular in cats suffering from HS. The HS-associated pattern of granule cell pathology differs significantly from that of HS-negative epileptics and controls. The clinical relevance of dentate gyrus involvement requires to be further investigated by neurobehavioral testing and may resemble a model for temporal lobe-associated comorbidities in epilepsy.

\* Diese Teilstudie wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. Marco Rosati, Dr. Jessica Molin, Dr. Andrea Wahle, Prof. Dr. Andrea Fischer, Dr. Lara Matiassek und PD Dr. Sven Reese aus der Tiermedizinischen Fakultät der LMU München sowie PD Dr. Thomas Flegel aus der Tiermedizinischen Fakultät der Universität Leipzig durchgeführt

## Introduction

The association between epilepsy and hippocampal sclerosis (HS) has been recognized for almost 200 years. Early studies described respective macroscopic and histological changes to the Ammon's horn and linked this feature to seizure activity (for review see Thom 2009 (THOM, 2009)). Since then, HS has been found, in particular, to be associated with therapy-resistant forms of epilepsy. The question whether HS is a cause or a consequence of the seizures has been widely investigated, but there is not one single satisfactory answer to this question (JEFFERYS, 1999).

Accounting for about 10% of epilepsy cases, temporal lobe epilepsy (TLE) resembles a rather common form of epilepsy in people (TELLEZ-ZENTENO & HERNANDEZ-RONQUILLO, 2012). Biopsy studies suggest that one critical factor for the development of drug-resistance in TLE consists in the occurrence of HS. This is underlined by the fact that 80% of the patients subjected to hippocampal surgery, including lesionectomy, lobotomy and lobectomy, benefit from postoperative seizure freedom of twelve months at least (BLUMCKE et al., 2007).

Along with the classic combination of pyramidal cell loss and reactive astrogliosis, defining HS, pathologic changes to the dentate gyrus (DG) are regularly recorded in HS patients (BLUMCKE et al., 2007; BLUMCKE et al., 2009). The DG constitutes a major relais station of incoming signals within the hippocampus and plays a crucial role in memory formation and navigation (VAN STRIEN et al., 2009). Based on its functions, the DG appears to have special impact on neuropsychiatric comorbidities of epileptic seizures such as cognitive decline.

In this vein, it has been shown in human TLE patients that those suffering from granule cell pathology (GCP) of any kind also show worse memory performance on standardized testing (PAULI et al., 2006; BLUMCKE et al., 2009). Conversely, an increased proliferative potential seen in explant cultures from DG biopsies correlated with better cognitive outcome. (CORAS et al., 2010)

GCP can be divided in two major subtypes: 1. hypocellular GCP characterized mainly by granule cell loss, and 2. iso/hypercellular GCP,



affecting mainly the architecture of the DG and not so much the cell-numbers (BLUMCKE et al., 2009). The most commonly found entities amongst these subtypes are thinning of the DG and granule-cell dispersion (GCD) respectively (EL BAHH et al., 1999; THOM et al., 2005; BLUMCKE et al., 2007; BLUMCKE et al., 2009).

The prevalence of GCP has been reported to affect between 45% and 86% of TLE patients and seems to correlate with the degree of neuronal loss from the pyramidal cell band as well as mossy fiber sprouting (EL BAHH et al., 1999; THOM et al., 2005; BLUMCKE et al., 2009; BLUMCKE et al., 2013b). Notably, GCP has also been documented in other conditions but TLE such as other epileptic syndromes or dementia and it can be asymmetric or even contralateral to a HS affected hippocampus (THOM et al., 2005; THOM et al., 2009a).

Changes to the DG likewise occur in rodent models of epilepsy (NADLER et al., 1978, 1980; SLOVITER, 1992). While it has been generally assumed that GCP evoked in laboratory settings resembles the situation in human epilepsy, GCP has not been sufficiently explored in large animal species suffering from natural epilepsy.

On the other hand, a recent study in dogs with idiopathic epilepsy has proven that dogs – similar to humans - suffer of behavioral abnormalities in the course of a seizure disorder (SHIHAB et al., 2011). Yet, it remains to be investigated whether pathologies of the temporal lobe, addressing DG or amygdala, may hold responsible for these behavioral changes in animals. A first step to further investigate this, has been achieved lately by reporting bilateral changes to the DG in one epileptic cat suffering of a hamartoma-like malformation of the hippocampus consisting in hypergyration and broadening of the dentate gyrus. Nevertheless, no connection to eventual behavioral abnormalities was drawn in this report (KLANG et al., 2015).

Recently we reported the occurrence of HS in cats suffering from different types of epilepsies (WAGNER et al., 2014). Histopathology and distribution to some extent mimicked human HS.

In this consecutive study, we now focused on DG changes in HS-positive

(HS<sup>+</sup>) and HS-negative epileptic cats (HS<sup>-</sup>) in order to collect information about the prevalence and clinical relevance of GCP in feline seizures.

## **Materials and Methods**

### *Case selection & semiologic classification*

This study was conducted on brains of epileptic cats and control animals subjected to postmortem examination for diagnostic purposes. Only cats with complete medical records were included that provided a reliable base for establishment of a seizure history. To be included into the epileptic group, cats required having been presented with recurrent seizure events and/or status epilepticus (SE)(WAGNER et al., 2014).

According to clinical algorithms (WAGNER et al., 2014), the seizures were classified into straightforward partial (P) and generalized (G) seizures, secondarily generalizing partial seizures (PCG), primary SE (SE) and secondary SE (GSE), resembling a culmination of generalised seizures.

Epileptic cats affected by structural abnormalities that interfered with DG evaluation (see below) were excluded upon histological brain investigation.

Prerequisites for inclusion into the control group were: (1) absence of paroxysmal episodes with seizure-like resemblance, including syncope, (2) evidence of a non-epileptic disorder or insult that held responsible for the observed morbidity and/or death.

### *General procedures*

All animals underwent a postmortem brain examination after extensive craniectomy, cranial nerve transection and transverse section at the medullospinal junction. Standard histology was carried out on selected visceral organs and the heart as well as on additional tissues subjected to specific organ damage.

As the peripheral tissues, the brain was immediately immersed in 10% neutral buffered formalin until processing.

### *Brain processing*

After at least 48 hours of fixation, the brain tissue was processed and trimmed as described previously (DE RISIO et al., 2012; WAGNER et al., 2014). For detailed assessment of the temporal lobe, the brains were cut in transverse sections through the temporo-ventral body of the hippocampus. Care was taken to set perpendicular sections through the dentate gyrus in order to avoid curvature artefacts. Subsequently, the sections were processed in an automatic tissue processor, running on a CNS cycle, and embedded in Paraplast®. Histological sections were cut with a microtome at 5 µm slice thickness. Amongst the histological stainings used for the full CNS work-up (WAGNER et al., 2014), GCP evaluation was based on hematoxylin-eosin (HE) stain.

### *Neuropathological examination*

Following tissue processing, the brains were generally inspected to identify histopathological changes. Histologic investigation was carried out with a Zeiss Axiophot® (Zeiss, Jena, Germany) at magnifications ranging from x5 to x1000.

With respect to the underlying seizure aetiology, the cats were sorted as follows: intracranial mass effect including neoplasia or diffuse edema (IC), vascular or vasogenic pathologies (V), metabolic or toxic disturbances (M), inflammatory brain diseases (Inf) and epilepsy of unknown aetiology. Animals presenting with more than one of these pathologies were sorted into the group of combined pathologies (Comb).

### *Assessment of hippocampal sclerosis*

HS was defined as pyramidal cell loss in any of the CA-segments plus reactive astrogliosis. The diagnosis of HS was based on the nerve cell-densities of the pyramidal cell band in CA1 through CA4. The distances between neighboring nerve-cell-nuclei were obtained as interneurononuclear-distance (INND) as described previously (WAGNER et al., 2014).

*Identification of granule-cell pathology (GCP)*

In agreement with the classification scheme for DG changes in epileptic humans, GCP was divided into GCP type 1, comprising granule cell loss, and GCP type 2 representing histoarchitectural changes with normal or increased neuronal density (BLUMCKE et al., 2007; BLUMCKE et al., 2013b).

For objective quantitative analysis, ten photomicrographs of every dentate gyrus were taken at x400 magnification. On each picture, the cells were tagged interactively with a cell counter tool and the INND was calculated using a modified Delaunay's triangulation plugin for Fiji image® processing package (Version 1.47 i). The thickness of the DG and number of cell layers were likewise obtained manually in two locations.

Reference ranges were established from control cats for granule cell layer (GCL) thickness, the number of cell layers and INND (*Table 1*).

DG pathology was sorted into GCP type 1 (1) if thinned by greater than or equal twofold standard-deviation of the reference GCL thickness or (2) if the DG showed gaps presenting as a focal discontinuity of the GC band.

GCP type 2, on the other hand, included (1) single ectopic granule cells, (2) clusters of ectopic granule-cells, (3) bilayering of the GCL and (4) dispersion of granule cells.

Ectopic granule cells were supposed to be located in the molecular layer (ML) discontinuous to the GCL while in GC dispersion (GCD) the GCL would appear broader due to increase of nerve cell counts and/or increased interneuronal spacing. The border to the ML in GCD was blurred.

Two situations with increased interneuronal spacing were distinguished: (1) D1 representing an increased thickness of the GCL without proportional increase in cell layers and (2) D2 resembling an increased spacing without significant broadening of the GCL.

### *Data analysis*

Occurrence of qualitative lesions and numerical values were collected and compared in between epileptic cats and controls, HS positive versus negative animals, semiological and nosological subgroups. Statistics were calculated and illustrated using PAST® and GraphPad Prism® statistic softwares. P values  $\leq 0.5$  were accepted indicating significance. In multiple comparisons, Bonferroni or Tukey correction algorithms were implemented.

To analyze the individual (non-parametric) criteria for GCP, Chi-Square-Testing was performed.

## **Results**

### *Demographics, semiology & nosology*

Altogether brain tissue was included from 86 epileptic cats and 17 controls. Age and gender distribution amongst the different populations are displayed in *Table 2*. With the expected selection bias of a postmortem study (WAGNER et al., 2014), the epileptic group only contains cases with severe, progressive or stagnant, therapy-resistant or fatal outcome. Hence, non-tolerable generalised seizures and status epilepticus prior to euthanasia or death were most common (for prevalence see *Table 2*).

Epilepsy was associated to structural epileptogenic pathologies in 68 cases. The cases were associated with the following types of principal brain lesions: 27/68 primary inflammatory encephalopathies, 11/68 intracranial mass lesions, 7/68 vascular encephalopathies, 7/68 metabolic and degenerative encephalopathies and 13/68 combined pathologies. Finally, 3/68 animals were found to suffer from HS without any other underlying brain pathology (dual pathology).

It proved not possible to identify an epileptogenic trigger in 18/86 cats (epilepsy of unknown aetiology).

### *Occurrence of GCP and its association to signalement, semiology and nosology*

Of all examined DG (n=168), 112 presented with GCP of any type (GCP<sup>+</sup>), while no DG lesions were seen in 56/168 cases (GCP<sup>-</sup>) without any interdependence with age or gender. This includes DG of 6/17 non-epileptic cats (35.3%) and of 65/86 (75.6%) cats suffering from epilepsy.

GCP was most commonly associated with generalized seizures or, otherwise, 73.4% of animals presenting with generalised seizures (58/79) were positive for GCP. There was no significant difference in the occurrence and relative risk of GCP amongst the other seizure semiologies. The prevalence of GCP<sup>+</sup> was significantly lower in non-epileptic cats as compared to cats with seizures ( $p=7.6 \times 10^{-6}$ , Chi-square test).

With respect to a specific aetiology of the seizures, only cats affected by inflammatory brain diseases were significantly at risk to develop GCP (88%;  $p=0.0002$ , Chi-square test) even though GCP<sup>+</sup> was more common than GCP<sup>-</sup> in mass lesions and metabolic/degenerative encephalopathies, as well ( $p \geq 0.1$ , Chi-square test).

In non-epileptic brains but also epileptic cats with vascular aetiologies and in cats suffering from epilepsy of unknown aetiology, GCP was less common.

In this regard, it is notable that the mean disease-duration in the GCP<sup>+</sup> group was 67 days (SD: 205.2) while the mean time of disease before death was 4.5 days (SD: 6.2) for the group without GCP. In spite of the great range of the SD for the GCP<sup>+</sup> group, the difference was found to be statistically significant ( $p=0.05$ , Student's t-test).

Amongst epileptic cats, it was notable that 40% of GCP<sup>-</sup> animals belonged to the group of epilepsy of unclear aetiology and therefore were least probable to develop GCP (26.8%). These data are summarized in *Table 3*.

#### *Occurrence of HS and its association to quantitative DG parameters and specific GCP features*

Independent of the aetiological subtype, 51/139 cases were identified to be HS positive. No HS was seen in 88/139 hippocampi and in the 29 controls (*Figure 1*).

As a group, HS positive epileptic cats showed a significantly thickened GCL with a mean GCL diameter of  $90.5 \pm 18.4 \mu\text{m}$  if compared to the reference range (RR) ( $p = 2.2 \times 10^{-5}$ , One-way ANOVA), obtained from control cats, extending from 53.2 to  $88.4 \mu\text{m}$  with a mean at  $70.5 \pm 8.8 \mu\text{m}$ . They also outscored HS<sup>-</sup> epileptic cats that had a mean layer thickness of  $72.7 \pm 12.7 \mu\text{m}$  ( $p = 2.2 \times 10^{-5}$ , One-way ANOVA).

Accordingly, the upper boundary was exceeded by 25/51 HS<sup>+</sup> cases, while outliers were seen only in one case of the control group and in 9/88 of HS<sup>-</sup> epileptic cats. The HS<sup>-</sup> group showed a significant thinning of the GCL in 8/88 samples. Even though this trend did not mount up to significant difference in GCL-diameter to the control group ( $p = 0.3$ , Student's t-test), thinning was found to be a characteristic of HS<sup>-</sup> animals only. These presented a DG thinner than average in 10/88 cases (10.9%). Statistical testing revealed thinning to be significantly more likely in HS<sup>-</sup> brains when compared to HS<sup>+</sup> cats ( $p = 0.02$ , Chi-square test).

The RR of cell layers within non-epileptic GCL extended from 3.2 to a maximum of 9.2 layers, with a mean of  $6.3 \pm 1.5$  cell layers. The average number of layers in both epileptic groups was within the RR with  $5.7 \pm 1.3$  cell layers in the HS<sup>+</sup> group and  $5.3 \pm 1.3$  layers in the HS<sup>-</sup> group. Outliers were rare and confined to the HS<sup>-</sup> and control groups only. Thereby, 3/88 of the HS negative hippocampi only scored lower than the RR. Paucity of cell layers in HS<sup>-</sup> samples differs significantly to the control group values ( $p = 0.002$ , One-way ANOVA).

The reference INND was calculated to range between  $10.9 \mu\text{m}$  and  $26.1 \mu\text{m}$  with a mean at  $18.5 \pm 3.8 \mu\text{m}$ . Within the control group, only one value exceeded the upper border. The HS<sup>+</sup> cats presented with a mean INND of  $21.5 \pm 5.3 \mu\text{m}$ , which differs significantly from the tighter interneuronal spacing in the control group ( $p = 0.001$ , One-way ANOVA) even though the RR was exceeded in two cases only. HS<sup>-</sup> animals showed a mean INND of  $20.7 \pm 4.3 \mu\text{m}$ , indistinct from the other two values. However, a positive deviation from the RR was observed in 5/88 cases (*Figure 2*).

Gaps within the GC band of the DG were almost evenly distributed across the three groups ( $p \geq 0.2$ , Chi-square test), yet they were somewhat scarcer

in the control group. Gaps were most frequently observed in the HS<sup>+</sup> group (9/51; 17.6%) followed by HS<sup>-</sup> brains (of cases (11/88; 12.5%).

Epilepsy was significantly ( $p \leq 0.005$ , Chi-square test) associated with ectopia of granule cells featured by 42.9% HS<sup>+</sup> samples and 31.5% HS<sup>-</sup> cases. Clusters of ectopic granule cells, in contrast, were rarely seen amongst epileptic DG (HS<sup>+</sup>: 2%; HS<sup>-</sup> 4.3%) as was bilayering of the DG that affected one single case of each epileptic subgroup (The different GCP-Patterns are depicted in *Figure 3*).

Implementing the significant results and trends from layer thickness, cellularity and cell density, plus the histoarchitectural delineation of the granule-molecular layer boundary and misplaced neurons, HS positive brains were affected by dispersion type D1 significantly more often than both the control group ( $p = 0.007$ , Chi-square test) and HS<sup>-</sup> epileptics ( $p = 4.8 \times 10^{-6}$ , Chi-square test). The D2 type, on the other hand, was not allocated to a certain clinical history and lesion pattern.

Sorting for the segmental subtypes of HS did not reveal a significant interdependence between an affected CA zone and occurrence or type GCP ( $p \geq 0.07$ , Chi-square test). However, trisegmental HS was significantly more prone to show more than one GCP subtype ( $p = 0.009$ , Chi-square test). Amongst those, the GCL thickening ( $p = 0.009$ , Chi-square test) and ectopic granule neurons ( $p = 0.004$ , Chi-square test) were specifically more prevalent than in mono-, bi- or tetrasegmental HS.

## Discussion

In this first systematic evaluation of the DG in epileptic cats, GCP were found to be relatively common with a prevalence of 66% of cats being affected.

GCP, however, were not distributed evenly throughout all groups of investigated cats. Instead more than 75% of GCP were associated with HS. HS<sup>-</sup> epileptics presented with GCP in 53.4% and non-epileptic controls in 24.1%

The prevalence of GCP in post-mortem studies and surgical samples from



human TLE-patients ranged between 40% (BLUMCKE et al., 2009) and 86% (THOM et al., 2005), which appears similar to GCP epidemiology in cats. Compliant with the hypothesis, that the DG plays a crucial role in memory-building (VAN STRIEN et al., 2009), many human studies have reported worse memory-scores for TLE patients affected by GCP. It has been suggested that memory-performance correlates with the severity of disruption to the architecture of the DG (PAULI et al., 2006; BLUMCKE et al., 2009), even though these data could not be reproduced by other researchers (THOM et al., 2010).

It also has been reported that the degree of GCP correlates with the severity of HS and the associated pyramidal cell loss (MATHERN et al., 1997; EL BAHH et al., 1999; THOM et al., 2009a; THOM et al., 2010). For the population of investigated cats, functional data on the cognitive state/abilities were hard to obtain, in particular for an out-house population.

Concerning structural data, GCP was overrepresented in feline epilepsy patients affected by HS that showed respective DG abnormalities in more than 75% of cases.

In particular broadening of the GCL, increase in the number of cell-layers, ectopic GCs as well as the hypercellular GCD variant D1 were the most common DG-abnormalities accompanying HS. Not all HS types however responded the same way. Amongst the HS forms, only trisegmental HS was significantly associated with GCL thickening and ectopic cells.

Albeit GCP being similarly prevalent in HS<sup>+</sup> cats as in humans, the spectrum and incidence varies in between the species (*Table 4*). This may be due to the nosological heterogeneity in the feline population.

However, throughout the subgroups of epileptic cats, we found that GCL thinning exclusively in HS<sup>-</sup> cases. Nine per-cent of these cases presented with DG thickness below normal range and/or less cell-layers than usual. In humans, on the contrary, thinning is the most common GCP feature of HS<sup>+</sup> TLE patients (BLUMCKE et al., 2009). No such data are available for the HS-negative group of patients.

In humans, GCP tend to accumulate in aged people and there is some body of evidence that it may be associated or just accompany the cognitive decline in the elderly (BANDOPADHYAY et al., 2014). Notably, the prevalence of GCP in neurologically healthy cats did not show age characteristics.

Comprising another difference to humans, GCP in the non-epileptic population does not appear to be age dependent while several studies report GCP in about 20% of elderly and/or demented people with a slightly attenuated degree, if compared to TLE (DICKSON et al., 1994; NELSON et al., 2011; BANDOPADHYAY et al., 2014). The 27.6% of non-epileptic GCP cats, instead, showed no age correlation. Clinical data on cognition and behavioral abnormalities prior to euthanasia were not considered reliable in this retrospective study.

While age does not correlate with the occurrence of GCP, also for the seizing cats, the duration of the observed epileptic syndrome had a strong impact on GCP development. Thus, animals with GCP presented a mean disease-duration of 67 days. GCP-free animals had a mean clinical observation time of 4.5 days only. A positive correlation between longer disease duration and the degree of GCD has been reported in humans as well (BLUMCKE et al., 2009)

It still is a matter of debate, what exactly causes disruption of the DG-architecture and whether this might be a sequel or a promoter of seizure-activity.

Changes to the hippocampal formation, in general, have been attributed to initial precipitating injuries (IPI), such as severe febrile seizures, in infants, or traumatic brain injury (HOUSER, 1990; MATHERN et al., 1995; EL BAHH et al., 1999; BLUMCKE et al., 2009), onset of seizures before the fourth year of age (LURTON et al., 1998) or prolonged and recurring seizure activity (PARENT et al., 1997; BLUMCKE et al., 2009).

Independent of the IPI, hippocampal changes may inflict disturbance in its connections to the DG. Regarding D1 type of DG changes, it has been argued that significant neurogenesis is age-dependent, meaning that TLE or any other kind of seizures will not promote the production of new

neurons(MAGLOCZKY et al., 2000; FAHRNER et al., 2007). Hence, the increase of GC-numbers would result of aberrant migration of adult granule cells with subsequent changes in distribution and morphology of their synapses (SLOVITER et al., 2012).

Other researches favor the possibility that the dispersion of GCs arises from adult neurogenesis from the subgranular layer of the DG. A certain neurogenic potential of the hippocampus has been documented in rats (PARENT et al., 1997), mice (JESSBERGER et al., 2005), dogs (VON RUDEN et al., 2012) as well as for humans (ERIKSSON et al., 1998).

Indeed, it was demonstrated that recurrent seizures or SE can trigger neurogenesis(PARENT et al., 1997; CHA et al., 2004). However, it also has been suggested that newborn GCs do not integrate properly into the DG. Instead they disperse into the molecular layer and eventually may form erroneous synapses.

The term GCP comprises a group of different entities. On one side, there are the architectural changes to the DG. While most reports only refer to GCD (HOUSER, 1990; WIESER, 2004; BANDOPADHYAY et al., 2014), Blümcke et al in 2009 proposed a grading-system involving also other disturbances than only dispersion of the granule cell band. They divide the GCP in two types, one originating mainly from granule-cell-loss (gaps and thinning), and the other consisting of mainly architectural changes (ectopic cells (also in clusters), dispersion and bilayering of the DG)(BLUMCKE et al., 2009). These patterns had already been reported previously but had not been recorded systematically(THOM et al., 2002).

On the other side, there is the enhancement of mossy-fibre-sprouting. First described in TLE-patients in 1990 (HOUSER et al., 1990), it has become a well appreciated indicator of DG disturbance, that correlates with the severity of hippocampal damage and persists a very long time, even after abolishment of the seizures (CAVAZOS et al., 1994; EL BAHH et al., 1999; THOM et al., 2009a).

In our study, we were only able to investigate the architectural changes of the DG granule cells. Since the study was performed on archived, formalin-fixed tissue, classic labelling of the mossy fibers via Timms

staining (IBATA & OTSUKA, 1969; SLOVITER, 1982) was not possible because of impossible pre-treatment. Another possibility for visualizing the zinc-molecules in the synaptic vesicles of the mossy fibers is the immunohistochemical labelling of zinc-transporter-3 (ZnT-3) (WENZEL et al., 1997). However, this staining has not been validated sufficiently in cats. The alternative antibody for immunohistochemistry labelling Dynorphin A reveal some degree of fiber sprouting, yet again, the results were not consistent enough to make a reproducible statement.

## **Conclusion**

In conclusion, in this study we found, that GCP is a common finding in epileptic cats suffering from HS (76.5%). In epileptic cats without signs of HS it can also be found, yet the patterns differ from those found for the HS<sup>+</sup> group.

The question about the role, GCP plays in the epileptic cats could not be answered, especially since the reported cognitive impairment in humans could not be retrospectively addressed in the domestic cats, included in this study. It would be the aim though, to implement neurocognitive parameters in upcoming prospective studies in feline epilepsy patients.

Our findings in this study support and complete the picture of feline HS resembling a complementary animal model of the human condition (WAGNER et al., 2014) and is therefore another step on the way of establishing this species as a model for naturally occurring HS and associated pathologies in epilepsy.

## References

- 1 Bandopadhyay R, Liu JY, Sisodiya SM, Thom M: A comparative study of the dentate gyrus in hippocampal sclerosis in epilepsy and dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014;40(2):177-190.
- 2 Blumcke I, Kistner I, Clusmann H, Schramm J, Becker AJ, Elger CE, et al.: Towards a clinico-pathological classification of granule cell dispersion in human mesial temporal lobe epilepsies. *Acta Neuropathol* 2009;117(5):535-544.
- 3 Blumcke I, Pauli E, Clusmann H, Schramm J, Becker A, Elger C, et al.: A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta Neuropathol* 2007;113(3):235-244.
- 4 Blumcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, et al.: International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia* 2013;54(7):1315-1329.
- 5 Cavazos JE, Das I, Sutula TP: Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *J Neurosci* 1994;14(5 Pt 2):3106-3121.
- 6 Cha BH, Akman C, Silveira DC, Liu X, Holmes GL: Spontaneous recurrent seizure following status epilepticus enhances dentate gyrus neurogenesis. *Brain Dev* 2004;26(6):394-397.
- 7 Coras R, Siebzehnrbuhl FA, Pauli E, Huttner HB, Njunting M, Kobow K, et al.: Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain* 2010;133(11):3359-3372.
- 8 De Risio L, Brown R, Tennant B, Sparkes A, Matiasek L, de Stefani A, et al.: Slowly progressive lymphohistiocytic meningoencephalomyelitis in 21 adult cats presenting with peculiar neurological signs. *J Feline Med Surg* 2012;14(4):250-256.

- 9 Dickson DW, Davies P, Bevona C, Van Hoeven KH, Factor SM, Grober E, et al.: Hippocampal sclerosis: a common pathological feature of dementia in very old (> or = 80 years of age) humans. *Acta Neuropathol* 1994;88(3):212-221.
- 10 El Bahh B, Lespinet V, Lurton D, Coussemacq M, Le Gal La Salle G, Rougier A: Correlations between granule cell dispersion, mossy fiber sprouting, and hippocampal cell loss in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1999;40(10):1393-1401.
- 11 Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al.: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998;4(11):1313-1317.
- 12 Fahrner A, Kann G, Flubacher A, Heinrich C, Freiman TM, Zentner J, et al.: Granule cell dispersion is not accompanied by enhanced neurogenesis in temporal lobe epilepsy patients. *Exp Neurol* 2007;203(2):320-332.
- 13 Houser CR: Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 1990;535(2):195-204.
- 14 Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR, Delgado-Escueta AV: Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J Neurosci* 1990;10(1):267-282.
- 15 Ibata Y, Otsuka N: Electron microscopic demonstration of zinc in the hippocampal formation using Timm's sulfide silver technique. *J Histochem Cytochem* 1969;17(3):171-175.
- 16 Jefferys JG: Hippocampal sclerosis and temporal lobe epilepsy: cause or consequence? *Brain* 1999;122 ( Pt 6):1007-1008.
- 17 Jessberger S, Romer B, Babu H, Kempermann G: Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells. *Exp Neurol* 2005;196(2):342-351.
- 18 Klang A, Thaller D, Schmidt P, Kovacs GG, Halasz P, Pakozdy A: Bilateral Dentate Gyrus Structural Alterations in a Cat Associated

With Hippocampal Sclerosis and Intraventricular Meningioma. *Vet Pathol* 2015.

- 19 Lurton D, El Bahh B, Sundstrom L, Rougier A: Granule cell dispersion is correlated with early epileptic events in human temporal lobe epilepsy. *J Neurol Sci* 1998;154(2):133-136.
- 20 Magloczky Z, Wittner L, Borhegyi Z, Halasz P, Vajda J, Czirjak S, et al.: Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 2000;96(1):7-25.
- 21 Mathern GW, Babb TL, Vickrey BG, Melendez M, Pretorius JK: The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain* 1995;118 ( Pt 1):105-118.
- 22 Mathern GW, Kuhlman PA, Mendoza D, Pretorius JK: Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56(2):199-212.
- 23 Nadler JV, Perry BW, Cotman CW: Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 1978;271(5646):676-677.
- 24 Nadler JV, Perry BW, Cotman CW: Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. *Brain Res* 1980;182(1):1-9.
- 25 Nelson PT, Schmitt FA, Lin Y, Abner EL, Jicha GA, Patel E, et al.: Hippocampal sclerosis in advanced age: clinical and pathological features. *Brain* 2011;134(Pt 5):1506-1518.
- 26 Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH: Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 1997;17(10):3727-3738.
- 27 Pauli E, Hildebrandt M, Romstock J, Stefan H, Blumcke I: Deficient memory acquisition in temporal lobe epilepsy is predicted by

- hippocampal granule cell loss. *Neurology* 2006;67(8):1383-1389.
- 28 Shihab N, Bowen J, Volk HA: Behavioral changes in dogs associated with the development of idiopathic epilepsy. *Epilepsy Behav* 2011;21(2):160-167.
  - 29 Sloviter RS: Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Neurosci Lett* 1992;137(1):91-96.
  - 30 Sloviter RS: A simplified Timm stain procedure compatible with formaldehyde fixation and routine paraffin embedding of rat brain. *Brain Res Bull* 1982;8(6):771-774.
  - 31 Sloviter RS, Bumanglag AV, Schwarcz R, Frotscher M: Abnormal dentate gyrus network circuitry in temporal lobe epilepsy. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, eds. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. Bethesda MD: Michael A Rogawski, Antonio V Delgado-Escueta, Jeffrey L Noebels, Massimo Avoli and Richard W Olsen.; 2012.
  - 32 Tellez-Zenteno JF, Hernandez-Ronquillo L: A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Treat* 2012;2012:630853.
  - 33 Thom M: Hippocampal sclerosis: progress since Sommer. *Brain Pathol* 2009;19(4):565-572.
  - 34 Thom M, Eriksson S, Martinian L, Caboclo LO, McEvoy AW, Duncan JS, et al.: Temporal lobe sclerosis associated with hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: neuropathological features. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68(8):928-938.
  - 35 Thom M, Liagkouras I, Elliot KJ, Martinian L, Harkness W, McEvoy A, et al.: Reliability of patterns of hippocampal sclerosis as predictors of postsurgical outcome. *Epilepsia* 2010;51(9):1801-1808.
  - 36 Thom M, Sisodiya SM, Beckett A, Martinian L, Lin WR, Harkness W, et al.: Cytoarchitectural abnormalities in hippocampal sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61(6):510-519.



- 
- 37 Thom M, Zhou J, Martinian L, Sisodiya S: Quantitative post-mortem study of the hippocampus in chronic epilepsy: seizures do not inevitably cause neuronal loss. *Brain* 2005;128(Pt 6):1344-1357.
- 38 van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP: The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 2009;10(4):272-282.
- 39 von Ruden EL, Avemary J, Zellinger C, Algermissen D, Bock P, Beineke A, et al.: Distemper virus encephalitis exerts detrimental effects on hippocampal neurogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012;38(5):426-442.
- 40 Wagner E, Rosati M, Molin J, Foitzik U, Wahle AM, Fischer A, et al.: Hippocampal sclerosis in feline epilepsy. *Brain Pathol* 2014;24(6):607-619.
- 41 Wenzel HJ, Cole TB, Born DE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD: Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(23):12676-12681.
- 42 Wieser HG: ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 2004;45(6):695-714.

## Tables

**Table 1:** Recorded changes to the GCL sorted by GCP-type and numerical values used to establish a reference range

	Mean	SD	RR	Definition
GCP Type 1				
<b>Thinning Gaps</b>	70.8 $\mu\text{m}$	8.8	53.2 - 88.4 $\mu\text{m}$	Any value under the RR Discontinuation of the GCL confined to a restricted area
GCP Type 2				
<b>Thickening</b>	70.8 $\mu\text{m}$	8.8	53.2 - 88.4 $\mu\text{m}$	Any value exceeding the established RR
<b>INND</b>	18.5 $\mu\text{m}$	3.8	10.9 - 26.1 $\mu\text{m}$	Any value over- or underreaching the RR
<b>Layers</b>	6.2	1.5	3.2 - 9.2	Any value over- or underreaching the RR
<b>EcGCs</b>				Single GCs lying clearly over the boundary to the ML
<b>Clusters</b>				Three or more GCs lying over the boundary to the ML
<b>Bilayering</b>				Sharp separation of the GC-band into two layers
<b>D1</b>			6.9 - 18.8	The relation between thickness of DG and cell layers
<b>D2</b>			0.14 - 6.42	The relation between INND and the thickness of DG

**Table 2:** Demographic data, seizure semiology and aetiology of the investigated cats

	<b>GCP +</b>		<b>GCP -</b>	
<b>Total</b>	71		32	
	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>Mean</b>	<b>SD</b>
<b>Age</b>	8.1	5.5	8.4	6.2
<b>Duration (d)</b>				
	67.0	202.8	4.5	6.0
<b>Gender</b>				
	<b>(n)</b>	<b>%</b>	<b>(n)</b>	<b>%</b>
<b>f</b>	43	60.6	19	59.4
<b>m</b>	28	39.4	13	40.6
<b>Seizure Type</b>				
<b>G</b>	36	50.7	12	37.5
<b>PC G</b>	3	4.2	1	3.1
<b>SE</b>	9	12.7	3	9.4
<b>G SE</b>	6	8.45	3	9.4
<b>P</b>	3	4.2	1	3.1
<b>x</b>	8	11.3	1	3.1
<b>Ctrl</b>	6	8.45	11	34.4
<b>Aetiology</b>				
<b>IC</b>	8	11.3	3	9.4
<b>V</b>	4	5.6	3	9.4
<b>M</b>	6	8.45	1	3.1
<b>Inf</b>	24	33.8	3	9.4
<b>AeU</b>	10	14.1	8	25.0
<b>HS only</b>	2	2.8	1	3.1
<b>Comb</b>	11	15.5	2	6.2
<b>Ctrl</b>	6	8.45	11	34.4

**Table 3:** Distribution of DG-pathologies over the HS+, HS- and control-group

	<b>HS+</b>		<b>HS-</b>		<b>Ctrl</b>	
	Tot	%	Tot	%	Tot	%
Quantitative criteria						
<b>Thickening</b>	25	49.0	8	9.1	1	3.4
<b>INND</b>	2	3.9	5	5.7	1	3.4
<b>Layers</b>	0	0	4	4.5	3	10.3
<b>Thinning</b>	0	0	8	9.1	0	0
<b>D1</b>	12	23.5	1	1.1	0	0
<b>D2</b>	1	2.0	7	8.0	1	3.4
Qualitative criteria						
<b>Gaps</b>	9	17.6	11	12.5	2	6.9
<b>EcGCs</b>	23	45.1	27	30.7	2	6.9
<b>Clusters</b>	1	2.0	4	4.5	0	0
<b>Bilayering</b>	1	2.0	1	1.1	0	0

**Table 4:** Comparison of feline GCP-findings to human data recorded by Blümcke et al (2009)

	<b>HS+ Cats</b>	<b>HS- Cats</b>	<b>HS+Humans (Blümcke et al 2009)</b>
	%		
<b>Thinning</b>	0	9.1	81.3
<b>Gaps</b>	17.6	12.5	42.7
<b>GCD</b>	23.5	1.1	51.0
<b>EcGCs</b>	45.1	30.7	46.9
<b>Clusters</b>	2.0	4.5	19.8
<b>Bilayering</b>	2.0	1.1	14.6

## Figure legends

### Figure 1

Venn-Diagram representing the proportions of investigated hippocampi from each HS-Group and controls in relation to the GCP-Groups

### Figure 2

Values of the Thickness, INND and number of cell-layers of the GCL sorted by Control

(Ctrl), epileptics without HS (HS-) and epileptics with HS (HS+).

The dotted lines represent the upper and under boundaries of the reference range.

The big dots indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ).

### Figure 3

Different patterns of granule cell pathology, brain, cat, H&E.

1. Normal feline dentate gyrus (DG)
2. Dispersed DG
3. Normal DG at higher magnification
4. Dispersed DG at higher magnification
5. Ectopic granule cells
6. Cluster of ectopic granule cells
7. Gap within the granule cell layer
8. Bilayering of the DG

Figure 1

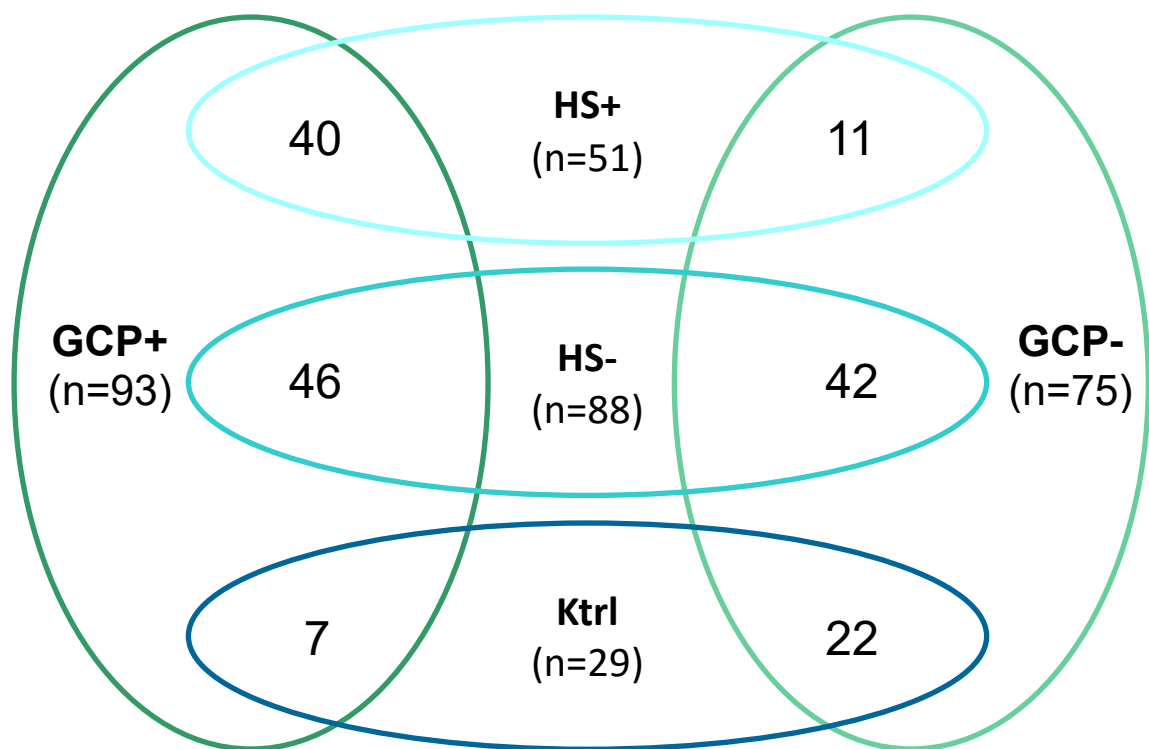
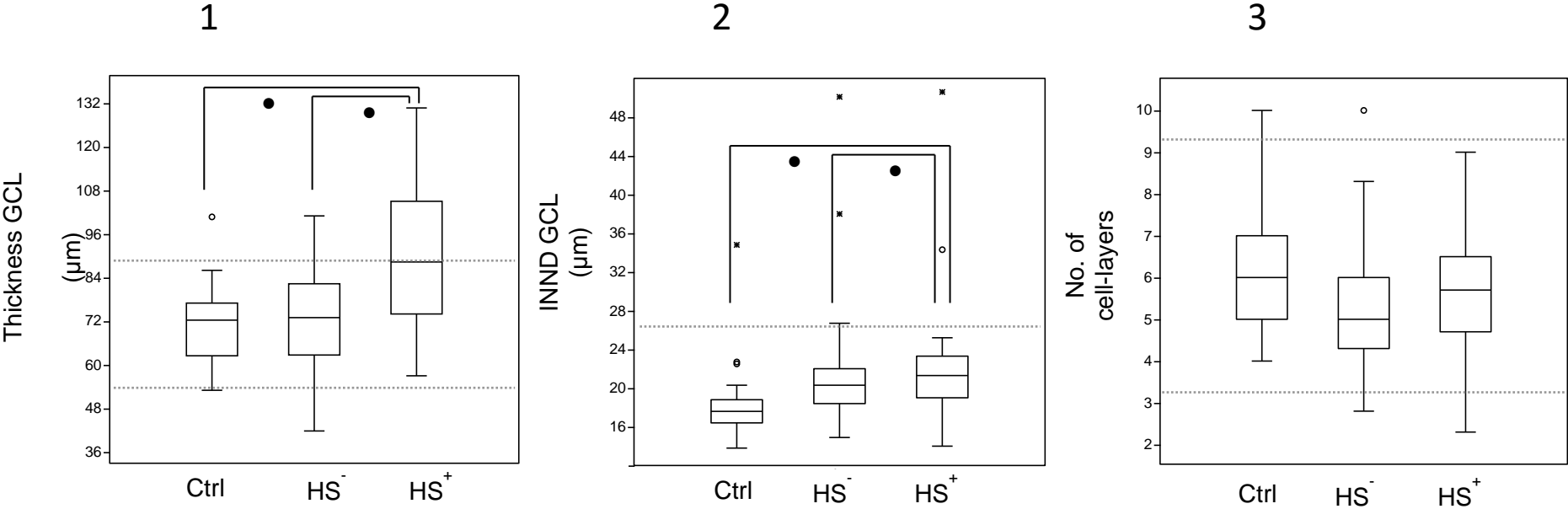
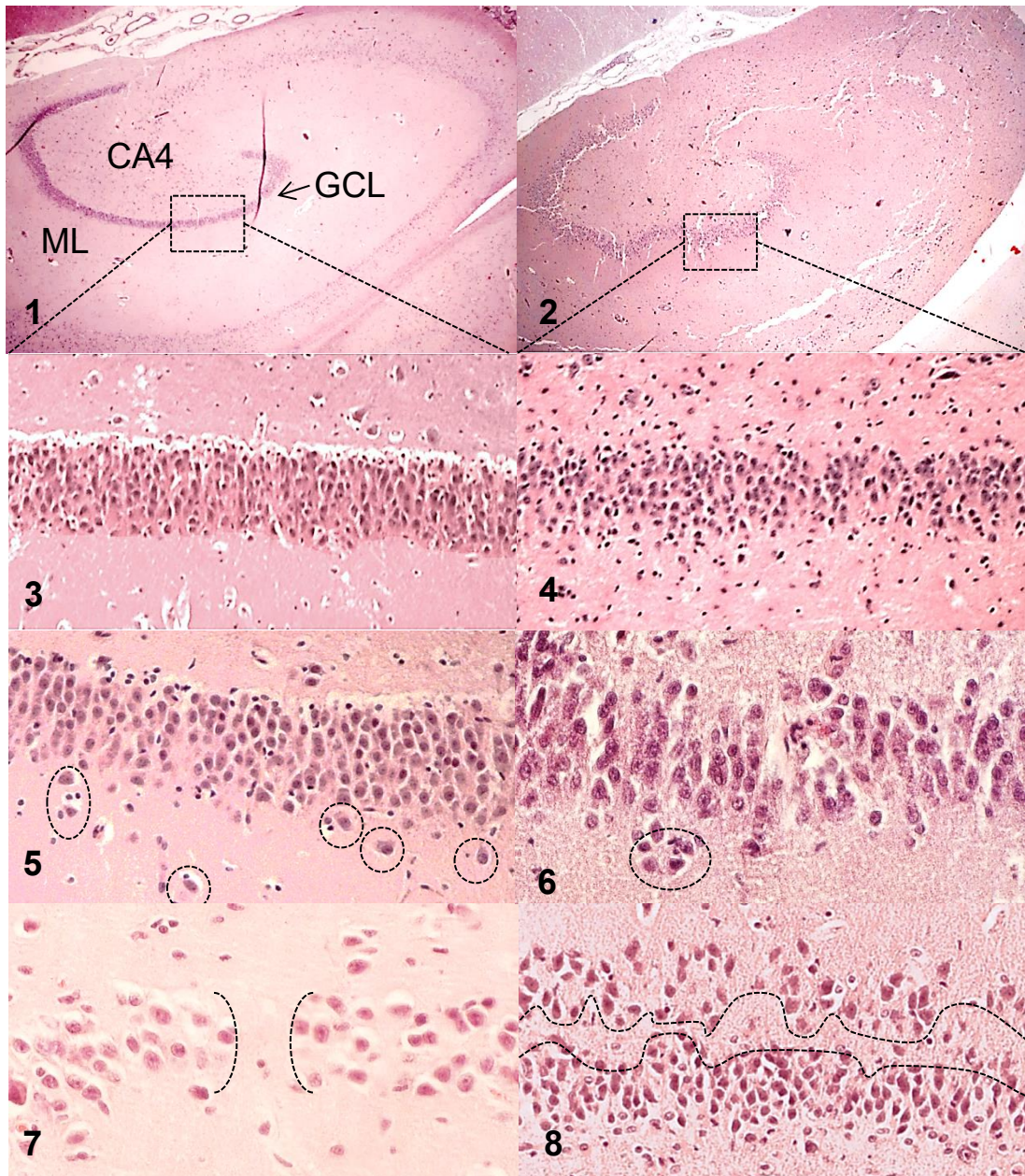


Figure 2



**Figure 3**



## V. DISKUSSION

### 1. Bisherige Erkenntnisse zu feliner Hippokampuspathologie

Obwohl hippokampale Pathologien mit Nervenzellverlust im Pyramidenzellband und vermehrter Astrozytenaktivierung (FATZER et al., 2000; SCHMIED et al., 2008; PAKOZDY et al., 2011) seit vielen Jahren mit feliner Epilepsie in Zusammenhang gebracht werden (DELGADO & SEVILLANO, 1961; GODDARD et al., 1969; WADA et al., 1986a), gibt es bisher keine systematischen Untersuchungen zur HS bei Katzen.

Analogieschlüsse wurden vor allem aus Tiermodellen an Nagern gezogen, dabei reichen experimentelle Untersuchungen an Katzen bis in die 1950er Jahre zurück. In diesen Studien wurden nach Chemikalieninjektionen in den Temporallappen - beziehungsweise direkt in den Hippocampus - HS-ähnliche Veränderungen beobachtet. Die Hippocampi dieser Katzen wiesen Zellverlust verschiedener Segmente des Ammonshorns sowie teilweise des DG auf (GASTAUT et al., 1959a; TANAKA et al., 1982) .

Sowohl bei diesen chemikalien-induzierten Modellen (GASTAUT et al., 1959a; TANAKA et al., 1982), als auch bei den Kindling Modellen (WADA et al., 1986a) fiel die Ähnlichkeit zwischen den Anfällen, die diese Katzen zeigten, und denen, unter denen TLE-Patienten klassischerweise leiden, auf. Beim Menschen werden die typischen Anfälle mit anfangs milden Zuckungen, besonders im Gesicht, häufig im Laufe der Erkrankung zu komplex-fokalen Konvulsionen mit Verlust des Bewusstseins. Die Patienten zeigen oraalimentäre Automatismen wie Kaubewegungen und Speicheln, rhythmisches Zucken der mimischen Muskulatur und gelegentlich Lautäußerungen (HORVATH et al., 2009). Eine motorische Komponente zeigt sich meist durch Flexion des kontralateralen Arms. Nach dem Abklingen des Anfalls sind die Patienten oft verwirrt und können unter Aphasie leiden (FRENCH et al., 1993; SPENCER, 2002). Die Ähnlichkeit zu den bei epileptischen Katzen beschriebenen orofazialen Anfällen ist frappierend (PAKOZDY et al., 2011). Auch hier gehen die Anfälle mit Zuckungen der Gesichtsmuskulatur, oralen Automatismen, Speicheln, Lautäußerungen und Kontraktionen der Vordergliedmaßen

einher (PARENT & QUESNEL, 1996; PAKOZDY et al., 2011).

Aufgrund der ähnlichen Symptomatik, liegt es nahe, den Grad hirnpathologischer Übereinstimmungen zwischen epileptischen Menschen und Katzen zu untersuchen. Doch in klinischen Studien an felines Epilepsiepatienten wurde bisher nur in seltenen Fällen eine histopathologische Aufarbeitung eventueller zerebraler Veränderungen vorgenommen. Die publizierten Studien basierten auf allgemeinpathologischen Algorithmen und berichteten dann nur in Einzelfällen von Zellverlust und Gliose im Pyramidenzellband (KLINE, 1998; SCHRIEFL et al., 2008; PAKOZDY et al., 2010).

Spezifischere Studien wurden erstmals im Zusammenhang mit der felines Hippokampusnekrose durchgeführt. Neben den typischen MRT-Befunden, wurde dieses Syndrom auch anhand seines spezifischen Läsionsmusters definiert (FATZER et al., 2000). Sowohl im Pyramiden- als auch im Körnerzellband der untersuchten Katzen konnten Parallelen, aber auch Unterschiede zu den beim Menschen bekannten Subtypen von HS und GCP festgestellt werden. (FATZER et al., 2000; BRINI et al., 2004; SCHMIED et al., 2008; PAKOZDY et al., 2011)

Ergänzend sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass HN und HS keinesfalls gleichzusetzen sind. Bei HN handelt es sich um ein akutes Geschehen, das – wie der Name schon sagt – mit ausgedehnten Nekrosen der Nervenzellen und akuter Aktivierung von Astrozyten einhergeht. Die Astrozyten präsentieren sich oft als Gemistozyten und die Neuronen zeigen sich meistens geschrumpft und weisen hypereosinophiles Zytoplasma auf (FATZER et al., 2000; SCHMIED et al., 2008; PAKOZDY et al., 2011). Bei HS handelt es sich dagegen um einen chronischen Prozesses mit finaler Depletion der Nervenzellen und fibrillärer Astrozytose (BLUMCKE et al., 2002). Ohne Zweifel kann eine HN in eine HS übergehen. Einen Hinweis hierauf gaben bereits Fatzer et al. mit der Feststellung, dass bei Katzen mit einer längeren Vorgeschichte von Anfällen, Pyramidenzellen fehlten und stattdessen eine fibrilläre Astroglieose zu finden war (FATZER et al., 2000).

Aufgrund der oben genannten Analogien zu humaner TLE und den

Berichten über HS-ähnliche Veränderungen in den Hippocampi von natürlich an Epilepsie erkrankten Katzen, sowie den Nachweisen dieser Veränderungen in SSSE-basierten Katzenstudien, (GASTAUT et al., 1959b; TANAKA et al., 1982) wurde die Hippokampuspathologie von unter Krämpfen leidenden Katzen in der hier präsentierten Studie eingehend untersucht. Die hier vorgestellte Arbeit stellt die erste systematische Untersuchung zur Hippokampuspathologie epileptischer Katzen dar. Ähnlichkeiten und auch Unterschiede zur humanen HS konnten aufgedeckt und präzisiert werden, was in Zukunft die Diagnose dieser Veränderungen deutlich erleichtern dürfte. Außerdem konnten diverse Parallelen bezüglich Pathomechanismen und Verlauf zwischen der HS des Menschen und der Katze festgestellt werden.

## **2. Anwendbarkeit humaner Grading-Systeme bei feline Epilepsiepatienten**

In der Humanmedizin hat sich eine systematische Einteilung der verschiedenen Muster der HS als hilfreich erwiesen, um anhand dieser eine genauere Aussage über das postoperative Outcome bezüglich Anfallsfreiheit und Gedächtnisfunktion treffen zu können (THOM et al., 2010; BLUMCKE et al., 2013a). Über die Jahre wurden verschiedene Schemata zur Klassifizierung der HS beim Menschen vorgeschlagen. Von methodisch relativ einfachen semiquantitativen Methoden (WYLER et al., 1992; BLUMCKE et al., 2009; BLUMCKE et al., 2013b) und Verfahren, die auf Spezialfärbungen setzten, (PROPER et al., 2001) über Einteilungen unter Zuhilfenahme von MRT-Befunden (WATSON et al., 1996), bis hin zu aufwändigeren Zähl- und Messverfahren (BLUMCKE et al., 2007; BLUMCKE et al., 2009), wurden bereits viele Einteilungen vorgeschlagen (Eine genaue Beschreibung der einzelnen Methoden findet sich in der Literaturübersicht unter 2.6.).

Der Vorteil der semiquantitativen, qualitativen Auswertungsmethoden (WYLER et al., 1992; BLUMCKE et al., 2013b) liegt, im Gegensatz zu Vorgehen die auf Zellzählungen (BLUMCKE et al., 2007) basieren, in der schnelleren Durchführbarkeit, da hier die Beurteilung direkt am

Schnittpräparat erfolgen kann, ohne dass vorher Fotografien der zu untersuchenden Areale aufgenommen werden müssen. Allerdings erfordert diese Art der Beurteilung ein größeres Maß an Erfahrung und es können je nach Untersucher unterschiedliche Ergebnisse entstehen.

Auswertungen, die auf Spezialfärbungen basieren, wie die von Proper et al. vorgeschlagene (PROPER et al., 2001), können bei der Beurteilung von HS eine große Genauigkeit erzielen. Der hauptsächliche Vorteil dieser Methode liegt darin, dass eine Beurteilung auch dann noch möglich ist, wenn nicht alle Hippokampussegmente vorhanden sind (PROPER et al., 2001). Allerdings sind solche Färbungen – wie in diesem Fall die Timm-Färbung zur Markierung der Moosfasern – aufwändig und erfordern eine Vorbehandlung des zu untersuchenden Gewebes mit einer Sulfidlösung. Das Sulfid komplexiert mit den Schwermetallionen (in diesem Fall Zink), die reichlich in den Enden der Moosfasern enthalten sind. Diese Metallkomplexe werden anschließend durch die Anlagerung reduzierter Silberionen sichtbar gemacht (IBATA & OTSUKA, 1969; SLOVITER, 1982). Da die Fixierung in Formalin die Komplexbildung mit den Zinkionen verhindert, muss die Perfusion mit der Sulfidlösung unbedingt vor der Fixation erfolgen. Dies macht eine nachträgliche Durchführung an bereits in Formalin fixiertem Gewebe unmöglich (SLOVITER, 1982). Somit kam diese Methode für eine retrospektive Aufarbeitung von archiviertem Material nicht in Frage.

Die von Watson et al. vorgeschlagene Einteilung der HS anhand des Symmetrieindex zwischen den Volumina der beiden Hippocampi kann besonders für die präoperative Diagnosestellung sehr hilfreich sein (WATSON et al., 1996). Eine korrekte Beurteilung mithilfe dieser Methode ist jedoch nur dann möglich, wenn sie – wie es in der Studie auch erfolgte – zunächst mit einem vorher etablierten histologischen Auswertungsschema korreliert wird. Ein ähnliches Vorgehen wurde bereits bei Hunden angewendet (KUWABARA et al., 2010a).

Bei der Evaluierung epileptischer Hunde zeigten sich – vergleichbar zu den von Watson beschriebenen Ergebnissen – Asymmetrien zwischen dem linken und dem rechten Hippocampus (WATSON et al., 1996). Bei den Kontrolltieren waren diese Unterschiede nicht festzustellen. Diese

Studie wies jedoch einige Limitierungen auf, weil eine Brücke zu den Veränderungen auf mikroskopischer Ebene aufgrund fehlender histologischer Auswertungen nicht geschlagen werden konnte (KUWABARA et al., 2010a). Die Bestätigung, dass die Asymmetrien der Hippocampi mit sklerotischen Veränderungen zusammenhängen, bleiben die Autoren hier schuldig. In einem prospektiven Studiendesign könnte dieses Verfahren jedoch eine interessante Möglichkeit darstellen, um eventuell auch bei der Katze eine präoperative Diagnosestellung der HS zu ermöglichen.

Aufgrund der oben genannten Limitierungen der verschiedenen Einteilungsmethoden bezüglich der Durchführbarkeit an bereits fixiertem Gewebe und der nicht für alle Katzen vorhandenen MRT-Aufnahmen, wurde zur Beurteilung der hippokampalen Nervenzelldichte bei epileptischen Katzen in der hier vorgestellten Studie, eine objektive Methode in Anlehnung an Blümcke et al. (BLUMCKE et al., 2007) gewählt. Da es vorher nur sporadische Berichte über HS bei Katzen gab (SCHRIEFL et al., 2008; PAKOZDY et al., 2011), sollte eine Verzerrung der Daten durch unterschiedliche Erfahrungsgrade der Untersucher vermieden werden. Es sollte so ein möglichst genauer Überblick über das Auftreten und die Ausprägung der felines HS erreicht werden. Nur die Beurteilung der Astroglieose wurde semiquantitativ vorgenommen.

Die Analyse der Abstände zwischen den Kernen der Pyramiden- und der Körnerzellen des Hippocampus (INND) bei nicht-epileptischen Kontrolltieren ergab einen eng gesteckten Referenzbereich für jedes einzelne der CA-Segmente, beziehungsweise den DG. Besonders bei den linearen Sektoren des Ammonshorns und beim DG war die Variation der INND mit einer Standardabweichung von etwa 5  $\mu\text{m}$  gering. Das CA4-Segment wies bei einer Standardabweichung von 18,6  $\mu\text{m}$  etwas größere Schwankungen auf. Der gewählte Referenzbereich anhand der INND-Messwerte der Kontrolltiere erstreckt sich um den Mittelwert dieser plus/minus der zweifachen Standardabweichung ( $\text{SD} \times 2$ ). Aufgrund der geringen Streuung der Messungen und der Tatsache, dass sich bis auf zwei Ausnahmen alle Werte innerhalb des gewählten Bereichs wiederfanden, wurde der Referenzbereich als repräsentativ angenommen.

### **3. Auswahl des Patientenguts und Aufarbeitung des zu untersuchenden Gewebes**

#### **3.1. Feline Epilepsiepatienten – Vor- und Nachteile gegenüber humanmedizinischen Studien**

Für den Ausgang einer Studie ist die Auswahl und Aufarbeitung des Probenmaterials essenziell. Aus der klinischen Ausrichtung der humanen Epilepsiepathologie bei gewebsbasierten Studien, ergibt sich eine sehr starke Präselektion der Patienten. Die Erkenntnisse basieren fast ausschließlich auf Biopsien, die bei chirurgischen Eingriffen zur Anfallskontrolle gewonnen wurden (BLUMCKE et al., 2007; THOM et al., 2009a; THOM et al., 2010; JARDIM et al., 2012). Dies impliziert außerdem, dass ausschließlich primär fokale Epilepsien – wie der TLE – so untersucht werden. Die Patienten haben immer eine lange Vorgeschichte von medikamentell unkontrollierbaren Anfällen, sodass ein chirurgischer Eingriff die letzte mögliche Therapie darstellt (SPENCER, 2002). Postmortale Studien an Epileptikern wurden bisher leider nur vereinzelt publiziert (MARGERISON & CORSELLIS, 1966; MEENCKE & JANZ, 1984; THOM et al., 2005; THOM et al., 2009b). Durch diese Einschränkungen fehlen zum einen die pathologischen Daten des gesamten Gehirns, was eine Evaluierung anderer krampfassoziierter Pathologien unmöglich macht. Zum Anderen fehlen auch Erkenntnisse bezüglich der Gehirnpathologie bei Patienten mit anderen Epilepsieursachen oder gut kontrollierten Anfällen (CABOCLO et al., 2012)

Aber auch die hier vorgestellte Studie ist nicht frei von einer gewissen Vorselektion des Patientenguts. Naturgemäß wird es bei einer retrospektiven pathologischen Studie immer eine Überrepräsentierung besonders schwerer Krankheitsverläufe geben. Andererseits dürfte es aufgrund der mittlerweile oft standardmäßig durchgeführten MRT-Untersuchungen neurologischer Patienten und der so erzielten prämortalen Diagnosestellung struktureller Gehirnerkrankungen, in der Sektion zu einer vermehrten Vorstellung submikroskopischer Hirnläsionen kommen. Auch sind mit Sicherheit einige Tiere, deren Epilepsie schon lange bekannt war, nach ihrem Tod nicht zur Obduktion gelangt, sodass

die Anzahl der chronischen Epileptiker in der Studie niedriger ausfallen könnte.

Nichtsdestotrotz ist es gelungen ein großes Spektrum an Alter, Anfallsarten unterliegenden Krankheiten und Krankheitsdauer zusammenzutragen. Im Rahmen dieser Studie sollte die Untersuchung an einer möglichst umfassenden Gruppe von Katzen durchgeführt werden, um den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Hippokampuspathologie und deren Auswirkungen besser untersuchen zu können. Diese Heterogenität in der Krankheitsätiologie und –nosologie des untersuchten Fallkonvoluts könnte einer der Gründe für die histoarchitektonischen Unterschiede zwischen der humanen und der felines HS darstellen.

Mit der - gegenüber den eng gesteckten Grenzen der TLE-Studien beim Menschen - breitgefächerte Auswahl an Anfallsursachen und –ausprägungen, sollte also eine möglichst unverzerrte Darstellung der Hippokampuspathologie epileptischer Katzen erreicht werden. Die Tatsache, dass HS über alle Krankheitsgruppen und Anfallsarten verteilt gefunden wurde, spricht dafür, dass der Hippocampus bei der Katze eine Art Auffangbecken für epileptische Aktivität darstellt, der darauf mit diesem spezifischen Muster reagiert. Ohne elektroenzephalographische Daten bleiben dies zwar Mutmaßungen, trotzdem ist es unwahrscheinlich, dass der Hippocampus in allen analysierten Fällen den epileptogenen Fokus darstellt. Diese Funde helfen bei der Suche nach einer Antwort auf die Frage, ob HS den Ursprung oder eine Folge epileptischer Aktivität darstellt zwar nur wenig weiter, vielleicht sind aber tatsächlich beide Varianten möglich.

### **3.2. Auswahl geeigneter Untersuchungsalgorithmen**

Durch die dreidimensional geschwungene Struktur des Hippocampus, erhält man - je nach Ebene - verschiedene Schnittbilder. Für die hier vorgestellte Auswertung ist eine Abgrenzung der Ammonshornsegmente zueinander nötig, was ausschließlich auf Schnitten möglich ist, die perpendicular zu den Zellbändern geführt werden. Um eine weitgehend standardisierte Beurteilung zu erreichen, wurden in dieser retrospektiven

Studie ausschließlich Schnittebenen des temporoventralen Hippocampus verwendet, bei denen möglichst lange ungekrümmte Abschnitte der Zellbänder zur Analyse zur Verfügung standen.

Die Verwendung von vorbearbeitetem Archivmaterial birgt das Risiko, dass die Daten aus den Auswertungen aufgrund unterschiedlicher Schnittebenen verzerrt werden. Die oben bereits erwähnte Einheitlichkeit der Messwerte der INND der Vergleichstiere zeigte jedoch, dass es sich hierbei um einen recht zuverlässigen Parameter handelt, der durch leichte Veränderungen der Schnittebene nicht nennenswert verändert wird.

Während die Astroglieose in der GFAP-Färbung problemlos semiquantitativ beurteilt werden kann, ist eine solche Auswertung der Nervenzelldichte in den Zellbändern nicht so leicht möglich. Besonders die Einschätzung eines gering- bis mittelgradigen Verlusts von Zellen dürfte unserer Erfahrung nach nur schwer mit bloßem Auge möglich sein. Ganz besonders das CA4-Segment ist wegen des fehlenden linearen Aufbaus kaum ohne Messungen zu beurteilen. Da es sich bei der INND um einen relativ leicht zu ermittelnden, gut reproduzierbaren Wert handelt, sollte dieser einer rein morphologischen Diagnosestellung zum jetzigen Zeitpunkt vorgezogen werden.

Besonders bei der semiquantitativen Beurteilung der GCP muss zur Vermeidung von Artefakten streng auf eine senkrechte Schnittführung geachtet werden und darauf dass ausschließlich gerade Areale des DG zur Auswertung herangezogen werden (BLUMCKE et al., 2009). Diese Schwierigkeit ist bei der Katze aufgrund der viel geringeren Gesamtgröße des DG noch viel größer als beim Menschen. Besonders die Messung der Gesamtdicke und der Zelllagen sowie eine Beurteilung der GCD sind unserer Erfahrung nach sehr anfällig für eine Störung durch inkorrekte Schnittführung. Zusätzlich ist auf Tangentialschnitten eine genaue Abgrenzung der GCL zur SGZ unmöglich.

Bei prospektiven Studien wäre es also aufgrund dieser Einschränkungen ratsam, den Zuschnitt des Gehirns so zu wählen, dass auf jeder Schnittebene durch den Hippocampus alle Segmente klar abgrenzbar sind. Nur so kann die Vergleichbarkeit der Werte garantiert werden. Ein



aus unserer Arbeitsgruppe stammendes und auch auf den Ergebnissen der hier präsentierten Studie beruhendes Konzept zur systematischen Beprobung für die Histologie von Hirnen epileptischer Hunde- und Katzenpatienten wurde im Rahmen der International Veterinary Epilepsy Task Force eingereicht.

#### **4. Segmentale Ähnlichkeiten und Unterschiede der humanen und felines HS**

Die von den untersuchten epileptischen Katzen gewonnenen Ergebnisse bezüglich des Auftretens von HS und GCP spiegeln in weiten Bereichen die histologische Situation beim Menschen wider. Andererseits sind auch speziesspezifische Besonderheiten - gerade bei der segmentalen Ausprägung von HS und der Häufigkeit der einzelnen GCP-Muster – offensichtlich.

Bei den Veränderungen des Pyramidenzellbandes fiel bei den Katzenhippokampi allgemein auf, dass das CA3-Segment insgesamt am häufigsten betroffen war. Es wurden sowohl mono- (17/41) als auch polysegmentale (24/41) Verteilungsmuster der felines HS bei Katzen festgestellt. Bei den monosegmentalen HS-Fällen waren die Sektoren CA3 und CA4 am häufigsten betroffen. Unter den polysegmentalen waren besonders die Kombinationen aus CA3 und CA4, CA1, CA2 und CA3 sowie die Ausdünnung aller Segmente, oder auch totale HS (BLUMCKE et al., 2007) besonders häufig anzutreffen. Einzig das beim Menschen als klassische HS definierte Verteilungsmuster CA1, CA3 und CA4 (WYLER et al., 1992) konnte bei den untersuchten Katzen nicht nachgewiesen werden. Außerdem stach die fehlende Nervenzellverlust-Aussparung des CA2-Sektors bei der Katze hervor, welche beim Menschen eine der typischen Eigenschaften der „klassischen“ HS darstellt (MARGERISON & CORSELLIS, 1966; SLOVITER, 1983; WYLER et al., 1992; WILLIAMSON & SPENCER, 1994; COHEN-GADOL et al., 2004).

Es wird vermutet, dass die Widerstandsfähigkeit der CA2-Pyramidenzellen beim Menschen von einzigartigen neurochemischen Eigenschaften

herrühren könnte. So gibt es verschiedene Berichte über die Rolle endogenen Adenosins (OCHIISHI et al., 1999), verschiedener Wachstumsfaktoren (CONNER et al., 1992; WOODWARD et al., 1992; TUCKER et al., 1993) und Kalzium-bindender Proteine (SLOVITER et al., 1991), die hauptsächlich im CA2-Segment nachzuweisen sind und sich positiv auf die Resistenz der Zellen auswirken könnten. Inwiefern dies auf die Katze zutrifft, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht sagen, da es zu dieser Thematik derzeit noch keine weiteren Erkenntnisse gibt.

Eine weitere Möglichkeit, die Unterschiede im histologischen Erscheinungsbild von HS zwischen Menschen und Katzen zu erklären, könnte auf den Divergenzen der hippokampalen und parahippokampalen Netzwerke dieser zwei Spezies basieren (INO et al., 1998).

Früher wurde das CA2-Segment des Menschen aufgrund fehlender Daten über die Einbindung in das hippokampale Netz oft übergangen oder wurde sogar als Teil des CA3-Sektors angesehen (BERNARD & WHEAL, 1994). Allerdings galt es schon immer als besonders resistent gegen anfallsbedingten neuronalen Verlust (SLOVITER, 1983; WILLIAMSON & SPENCER, 1994; COHEN-GADOL et al., 2004). Entgegen dieser lange vorherrschenden Meinung, zeigten neueste Erkenntnisse jetzt, dass CA2 Afferenzen aus der zweiten Lage des Entorhinalen Kortex erhält (CHEVALEYRE & SIEGELBAUM, 2010). Es wird sogar von einem alternativen polysynaptischen Schaltkreis zwischen Entorhinalem Kortex, DG, CA2 und der tiefen Lage des CA1 berichtet (KOHARA et al., 2014). Implikationen aus dieser neuen Feststellung für die Resistenz des CA2-Sektors gegenüber krampfbedingten Schäden wurden jedoch noch nicht gezogen (KOHARA et al., 2014).

Bei der Katze wurden verschiedene antero- und retrograde Studien durchgeführt, um die Verbindungen kortikaler Strukturen, besonders des entorhinalen Kortex und des Hippocampus darzustellen (IRLE & MARKOWITSCH, 1982; WITTER & GROENEWEGEN, 1984; VAN GROEN & DA SILVA, 1985; VAN GROEN & DA SILVA, 1986; VAN GROEN et al., 1986; VAN GROEN & WYSS, 1988). Hierbei zeigte sich, dass das CA2-Segment ebenso üppig mit Fasern aus dieser Region versorgt wird, wie alle anderen Sektoren. Das CA2-Segment der Katze

erhält also Fasern aus den Lagen II bis VI der medialen und ventrolateralen entorhinalen Gegend (INO et al., 1998, 2001). Es wäre also möglich, dass die fehlende Aussparung des CA2-Sektors bei der feline HS unter anderem auf diese – im Vergleich zum Menschen – üppigen Verknüpfungen mit der entorhinalen Rinde zurückzuführen ist.

Neben dem Pyramidenzellband, wird beim Menschen bei der Evaluierung von HS auch das Körnerzellband berücksichtigt. Die von Blümcke et al. (BLUMCKE et al., 2009) erstmals systematisch kategorisierten Anomalitäten des DG bei TLE-Patienten mit HS konnten in ihren wesentlichen Zügen auch in den hier analysierten Katzenhippocampi wiedergefunden werden. Etwa drei Viertel der epileptischen Katzen wiesen mindestens eine Unterart der GCP auf. Bei humanen Patienten wurde von einer ähnlichen Häufigkeit dieser Veränderungen berichtet (BLUMCKE et al., 2009). Bezüglich des Vorkommens der einzelnen Muster der GCP müssen aber verschiedene tierartliche Besonderheiten erwähnt werden. Während beim Menschen mit HS am häufigsten eine Ausdünnung der Körnerzellschicht diagnostiziert wurde (BLUMCKE et al., 2009), waren bei Katzen mit HS, Verdickung und Dispersion die häufigsten Veränderungen. Eine Ausdünnung der GCL war dagegen einzig bei epileptischen Katzen ohne HS nachweisbar. Gruppen ektopischer Körnerzellen, Lücken in der GCL sowie eine Bilaminierung des DG wurde bei Katzen viel seltener als beim Menschen gefunden. Trotzdem ist GCP insgesamt ein häufiger Befund bei epileptischen Katzen, wobei jedoch auch beachtet werden muss, dass in der oben vorgestellten Studie auch gut 35% der nicht epileptischen Tiere GCP aufwiesen.

## 5. Vorschlag eines Grading-Systems für feline HS

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass humane Schemata zur Einteilung der HS bei der Katze nur bedingt anwendbar sind. Unter Berücksichtigung der katzenspezifischen Besonderheiten der segmentalen Verteilung von HS, wird hier folgende Einteilung der feline HS vorgeschlagen, um die erhobenen Daten besser zu systematisieren und auf die Besonderheiten dieser Spezies angemessen einzugehen:

- a. fHS Typ 0  
keine Veränderung der Nervenzelldichte – physiologischer Hippocampus.
- b. fHS Typ 1  
Monosegmentale HS mit einer INND, die den Referenzwert für das entsprechende Segment mindestens um die zweifache Standardabweichung der Kontrollgruppe (2xSD) überschreitet.
- c. fHS Typ 2  
Reduktion der Neuronendichte in zwei Segmenten, die sich in einer INND mindestens über der 2xSD äußert. Häufig findet sich hier die auch beim Menschen bekannte End-folium-Sklerose (WYLER et al., 1992; BLUMCKE et al., 2007).
- d. fHS Typ 3  
Trisegmentale HS bei der mindestens eins der betroffenen Segmente eine INND aufweist, die den Referenzbereich um mindestens die vierfache SD der Kontrollgruppe (4xSD) übersteigt. Bei dieser Form der fHS findet man häufig zusätzlich eine Verdickung der GCL oder ektopische Körnerzellen in der ML.
- e. fHS Typ 4  
Alle CA-Sektoren sind von Ausdünnung betroffen. In mindestens einem Segment wird der obere Normalwert der INND um die sechsfache Standardabweichung der Vergleichstiere (SDx6) überschritten. Diese Form der HS ist mit der totalen HS bei TLE-Patienten zu vergleichen (WYLER et al., 1992; BLUMCKE et al., 2007).

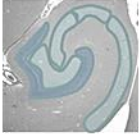
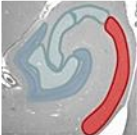
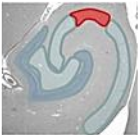
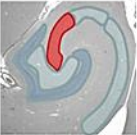
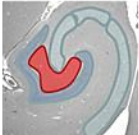
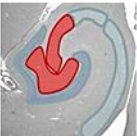
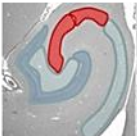
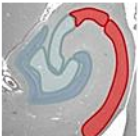
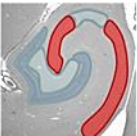
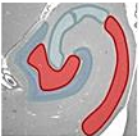
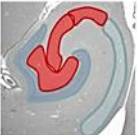
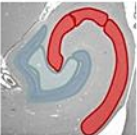

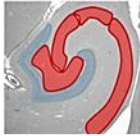
All diese Veränderungen müssen zwingend von einer Astrogliose in dem entsprechend betroffenen Segment begleitet sein und gehen häufig mit einer Unterart der GCP einher.

*Abbildung 5 zeigt eine Tabellarische Auflistung der fHS-Typen.*

Diese Einteilung basiert auf der Messung der Abstände zwischen den Kernen der Nervenzellen, weil eine rein semiquantitative Einschätzung des Nervenzellverlustes, wie weiter oben bereits erwähnt, unserer Meinung nach gerade bei gering bis mittelgradigen Veränderungen kaum möglich sein dürfte. Besonders bei milder oder auch monosegmentaler HS sei hier also besondere Vorsicht bei der Evaluierung angeraten.

Bei der Beurteilung der GCP unterscheiden sich die verschiedenen Parameter hinsichtlich der Schwierigkeiten bei ihrer Erkennbarkeit. Als besonders leicht zu erkennen erwies sich die zwar seltene, aber sehr eindrückliche Bilaminierung des DG. Das Erkennen einzelner oder von Gruppen ektopischer Körnerzellen erfordert eine Unterscheidung von Körnerzellen und Nervenzellen, die auch unter normalen Umständen in der ML zu finden sind (AMARAL et al., 2007). Lücken in der GCL dürfen nicht mit Artefakten verwechselt werden, die durch in diesem Bereich verlaufende Gefäße entstehen können. Eine sorgfältige Untersuchung der weiteren Umgebung auf Gefäßanschnitte ist daher ratsam. Die Diagnosestellung von GCD, Verdickung oder Ausdünnung der GCL erwies sich als am schwierigsten. Es sollte immer der Vergleich zu einem physiologischen DG herangezogen werden und eine Diagnose sollte stets durch Messwerte bestätigt werden.

**Abbildung 5:** Vorgeschlagenes Gradingssystem für feline HS

<b>Einteilung der feline Hippokampussklerose</b>				
<b>fHS Typ 0</b>	keine Veränderung der Nervenzelldichte			
	 fHS 0			
<b>fHS Typ 1</b>	<b>Betroffene Segmente</b> Monosegmental	<b>INND</b> $\geq 2xSD$	<b>Astrogliose</b> ja	
	 fHS 1a	 fHS 1b	 fHS 1c	 fHS 1d
<b>fHS Typ 2</b>	<b>Betroffene Segmente</b> Bisegmental	<b>INND</b> $\geq 2xSD$	<b>Astrogliose</b> ja	
	 fHS 2a	 fHS 2b	 fHS 2c	 fHS 2d
				 fHS 2e
<b>fHS Typ 3</b>	<b>Betroffene Segmente</b> Trisegmental	<b>INND</b> $\geq 2xSD$ $\geq 4xSD$ mind. 1 Segm.	<b>Astrogliose</b> ja	
		 fHS 3a	 fHS 3b	 fHS 3c
<b>fHS Typ 4</b>	<b>Betroffene Segmente</b> Pansegmental	<b>INND</b> $\geq 2xSD$ $\geq 6xSD$ mind. 1 Segm.	<b>Astrogliose</b> ja	
				 fHS 4

## **6. Überlegungen zu akuten und chronischen Epilepsiemodellen**

Die verschiedenen Möglichkeiten der modellartigen Verwendung von Labornagern haben die Epilepsieforschung bereits um viele Erkenntnisse bereichert. Sie erfordern jedoch eine kritische Auseinandersetzung, da jedes der verschiedenen Modelle seine Vor- und Nachteile hat.

Modelle akuter Epilepsie, bei denen bei gesunden Tieren durch elektrische Impulse (SWINYARD et al., 1952) oder Chemikalien (FRANKLIN et al., 1988) ein epileptischer Anfall erzeugt wird, zeichnen sich durch ihre schnelle Verfügbarkeit als gute Screening-Methode für Antiepileptika aus. Nachteilig ist hierbei jedoch, dass über die Mechanismen der Epileptogenese unter natürlichen Umständen keine Aussage getroffen werden kann (LOSCHER, 2002). Des Weiteren können bei diesem Vorgehen Medikamente übersehen werden, die erst im chronischen Krankheitsstadium wirksam wären (FRENCH et al., 2013; GALANOPOULOU et al., 2013; POTSCHKA, 2013; SIMONATO et al., 2014).

Modelle chronischer Epilepsie könnten helfen, diese Lücke zu überbrücken. Die Tiere werden hierzu entweder durch Chemikalien oder elektrische Impulse gekindelt, oder es wird ein SE erzeugt, der nach einer Latenzzeit spontan auftretende Anfälle zur Folge hat. (siehe für nähere Informationen hierzu auch Literaturübersicht Kapitel 3.) Chronische Modelle für Epilepsie spiegeln den Krankheitsverlauf und die Gehirnpathologie beim Menschen zu einem gewissen Grad wider (REPRESA et al., 1989; CAVAZOS & SUTULA, 1990). Limitierungen bei dieser Art der Tiermodelle bestehen einerseits im hohen Kosten- und Zeitaufwand (LOSCHER, 2002; POTSCHKA, 2013), andererseits werden die zu erprobenden Medikamente oft anders appliziert, als das beim Menschen der Fall wäre (zum Beispiel intraperitoneal oder intrazerebral), was zu einer veränderten Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit führen kann (GALANOPOULOU et al., 2013).

Außerdem muss beachtet werden, dass mit diesen Modellen in ihrer heutigen Form die schon lange gestellte Frage darüber, ob die HS eine

Folge oder eine Ursache für die Progression der Epilepsie ist, nicht beantwortet werden kann (POTSCHKA, 2013). Da hier in jedem Fall ein konkreter Insult im Gehirn der Tiere gesetzt wird, ist die Übertragung auf die Epilepsie beim Menschen – für die es unzählige und manchmal keine ersichtlichen Ursachen gibt – nur eingeschränkt möglich (SIMONATO et al., 2014).

Der Studienaufbau der chronischen Epilepsiemodelle ist ebenso durch die geringe Lebensspanne der verwendeten Ratten und Mäuse begrenzt (STEWART et al., 2012). Langzeitdaten über das Leben mit oder ohne Therapie können nicht gewonnen werden. Außerdem sollten auch die Unterschiede bei der Gehirnentwicklung zwischen Ratten und Menschen in Betracht gezogen werden. Störungen des Gehirnstoffwechsels in der frühen Kindheit durch beispielsweise hohes Fieber (MEYER et al., 1954; BLUMCKE et al., 2002; LEWIS et al., 2014) oder Komplikationen bei der Geburt (MEYER et al., 1954; MARGERISON & CORSELLIS, 1966) werden mehrheitlich als möglicher Auslöser für die Entstehung von HS akzeptiert. Eine Übertragung zwischen den beiden Arten dürfte unter anderem aufgrund von Unterschieden bei der Myelinisierung und der Verteilung der Neurotransmitter (POTSCHKA et al., 2013; SIMONATO et al., 2014) eher schwierig sein.

Eine Sonderstellung in Bezug auf die zuletzt geäußerten Limitierungen nehmen hier die Kindlingmodelle an Katzen ein, die in den 1960er Jahren etabliert wurden (DELGADO & SEVILLANO, 1961). Während sich der Kindlingprozess bei dieser Tierart gleichförmig zu dem bei Nagern entwickelt (WADA et al., 1986a) und somit die limbischen Anfälle beim Menschen gut widerspiegelt, bleibt nichtsdestotrotz die Problematik der direkten Gehirnschädigung durch Elektroden oder Injektionskanülen, die pathologische Befunde in diesem Bereich überdecken könnten (SIMONATO et al., 2014).

Auch wenn Epilepsiemodelle für die Forschung wertvoll und unverzichtbar sind, wäre die Etablierung eines spontanen Tiermodells zur Entstehung und Entwicklung epilepsieassoziierter Gehirnveränderungen eine wertvolle Ergänzung. Bisher wurden hierfür hauptsächlich Hunde in Betracht gezogen. Verschiedene Studien berichten über rassespezifische



genetische Epilepsien, die in ihren Mechanismen und Ausprägungen denen des Menschen ähneln (JOKINEN et al., 2007; BERENDT et al., 2009; HULSMeyer et al., 2010). Auch für die Entstehung epileptischer Foci nach Schädel-Hirn-Trauma eignen sich Hunde als natürliche Modelltiere, da bei ihnen – wie beim Menschen – eine starke Korrelation zwischen traumatischen Gehirnverletzungen und dem Auftreten posttraumatischer Epilepsie nachgewiesen werden konnte (STEINMETZ et al., 2013).

Bezüglich des Auftretens spezifischer Hippokampusveränderungen bei epileptischen Hunden herrscht jedoch Uneinigkeit. Während von HS-ähnlichen Veränderungen bisher nur in Einzelfällen berichtet wurde (YAMASAKI et al., 1991; MELLEMA et al., 1999), ergab eine Studie bei Hunden mit pharmakoresistenter Epilepsie keinen Hinweis auf Nervenzellverlust oder Gliose im Hippocampus (BUCKMASTER et al., 2002). Da außerdem die bisher durchgeführten MRT-basierten Untersuchungen nicht mit histopathologischen Analysen untermauert wurden (KUWABARA et al., 2010a), kann bisher keine sichere Aussage über das Auftreten von HS bei epileptischen Hunden gemacht werden (POTSCHKA et al., 2013).

Im Gegensatz zu den bisher für Hunde publizierten Daten, wurde bei den in dieser Arbeit untersuchten epileptischen Katzen, regelmäßiges Auftreten von fHS nachgewiesen. Die untersuchten Hippocampi zeigten in ihren Veränderungen starke Ähnlichkeit zur HS der Menschen. Des Weiteren ist bekannt, dass Katzen häufig limbische Anfälle mit Tendenz zur Generalisierung zeigen (PAKOZDY et al., 2011; VANHAESEBROUCK et al., 2012), was ebenfalls bei TLE-Patienten oft der Fall ist (TASCH et al., 1999; BONE et al., 2012). Auch im MRT fand man HS-typische Befunde mit T2-Signal hyper- und T1-Signal hypointensität (SCHMIED et al., 2008; PAKOZDY et al., 2011; VANHAESEBROUCK et al., 2012). Berücksichtigt man die speziesspezifischen Unterschiede in der segmentalen Ausprägung der HS, könnte sich die fHS der Katzen zur näheren Untersuchung der unterliegenden Prozesse und Entwicklung von HS mit Übertragung auf den Menschen eignen.

## **7. Vorschläge für die weitere Untersuchung von fHS**

Um die durch diese retrospektive Studie gesammelten Daten weiter zu untermauern, werden prospektive Untersuchungen mit standardisierten klinischen, bildgebenden und histopathologischen Untersuchungen von Nöten sein.

Auf klinischer Ebene sollte zum einen eine Korrelation mit klinischen Daten durch genaue Erhebung der Anfallsart und Häufigkeit zur Klärung des Zusammenhangs von fHS mit limbischen, orofazialen Anfällen beitragen. Außerdem sollte in Zukunft auch größeres Augenmerk auf das Verhalten der Tiere gerichtet werden – sowohl peri- als auch interiktal – um die Rolle der GCP für das Verhalten und die kognitiven Funktionen betroffener Katzen besser einordnen zu können. Hochauflösende MRT-Aufnahmen sollten auf spezifische Veränderungen im Hippocampus untersucht werden, um eventuell eine intravitale Diagnose der fHS zu ermöglichen. Hierzu wären auch Verlaufsuntersuchungen nützlich um akute von chronischen Krampfschäden unterscheiden zu können.

Auf neuropathologischer Ebene sollte eine weitreichende Aufklärung verschiedener Mechanismen auf Zell- und Molekularebene erfolgen. Die genauere Analyse der Synaptischen Verbindungen im Katzenhippocampus könnte die Segmentierung des Ammonshorns weiter definieren. Auch die Frage nach der Konsequenz aus der bei der Katze fehlenden Aussparung des CA2-Sektors vor Sklerose erfordert weitere Untersuchung.

Zur vollständigen Aufarbeitung der GCP sollten die hier präsentierten Daten mit der Evaluierung der Moosfasersprossung zusammengebracht werden. Neben der Timm-Färbung, ist auch eine immunhistochemische Markierung der Moosfaserendigungen möglich. Eine Anwendung von Anti-Dynorphin-Antikörpern zu diesen Zwecken wurde an den Katzen dieser Studie bereits durchgeführt (Daten nicht publiziert), allerdings war die Färbung insgesamt sehr schwach und auch sehr inkonstant, sodass sich keine konkreten Schlüsse daraus ziehen ließen. Laut persönlicher Einschätzung humaner Epileptopathologen, ist diese Markierung – obwohl sie zwar verwendet wird (THOM et al., 2009b) - auch beim

Menschen anfällig für Artefakte. Die Markierung des Zink-Transporters-3 (ZnT3), der in Gehirnregionen mit hohem Zinkgehalt, vorkommt liefert beim Menschen verlässliche Ergebnisse (WENZEL et al., 1997). Eine Anwendung dieses Antikörpers wurde bei der Katze bisher nicht beschrieben, ist aber gerade in der Erprobung.

Schließlich wäre die Untersuchung des neurogenetischen Potenzials des DG der Katze wünschenswert. Besonders bei den verdickten GCL der fHS-positiven Katzen stellt sich die Frage, ob es sich bei der Zellvermehrung hier um adulte Neurogenese handelt. Beim Hund wurde das Auftreten von Mitosefiguren im DG eines epileptischen Schäferhundwelpen beschrieben und mit Neurogenese in Zusammenhang gebracht (BORSCHENSKY et al., 2012). Auch bei Katzen mit HN wurde dieses Phänomen beschrieben (FATZER et al., 2000). Bei unseren Untersuchungen haben wir ebenfalls bei zwei Tieren mehrere Mitosefiguren in der GCL des DG gefunden (Daten nicht publiziert). Da sich diese Mitosen jedoch nicht in der SGZ befanden – wo die Stammzellen des DG anzutreffen sind (ERIKSSON et al., 1998; PARENT & KRON, 2012) – scheint es wahrscheinlicher, dass es sich hierbei um Glio- statt um Neurogenese handelte. Genauere Analysen dieses Phänomens werden aber von absoluter Notwendigkeit sein, um eine konkrete Aussage treffen zu können. Immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen Doublecortin (markiert migrierende Zellen), Ki67 (bindet an sich teilende Zellen) und Nestin (Marker neuronaler Stammzellen) an den Katzen mit GCP sind daher bereits in Planung (JESSBERGER et al., 2005).

Schlussendlich ist bei der Erforschung der Hippokampusveränderungen epileptischer Katzen noch ein weiter Weg zu gehen. Diese morphologische Studie stellt auf diesem Weg einen ersten, wegweisenden Schritt dar.

## **VI. ZUSAMMENFASSUNG**

### **Untersuchungen zu spezifischen hippocampalen Läsionsmustern bei epileptischen Katzen**

Von Eva Katharina Wagner

In dieser Studie wurde die Hippokampuspathologie epileptischer Katzen analysiert und auf das Auftreten und die Ausprägung von Hippokampussklerose (HS) und Körnerzellpathologie (GCP) untersucht. Außerdem wurden unter Berücksichtigung speziesspezifischer Besonderheiten Parallelen zur menschlichen HS gezogen.

Insgesamt wurden Gehirne von 93 Katzen mit klinisch dokumentierten Anfällen aufgearbeitet und einer detaillierten histopathologischen Revision unterzogen. Außerdem wurde eine dem Alters- und Geschlechtsprofil angepasste Kontrollgruppe untersucht.

Auf Höhe des temporo-ventralen Hippokampuskörpers wurden quer zur Längsachse verlaufende Schnitte angefertigt. Diese wurden anschließend nach Standardalgorithmen aus der Humanmedizin untersucht. Hierzu wurde mithilfe digitaler Bildanalyse die interneurononukleäre Distanz (INND) zwischen den Pyramidenzellen in den Cornu-Ammonis-Segmenten (CA) 1 bis CA 4 und zwischen den Zellen des Körnerzellbandes gemessen. Dieser Parameter ließ Rückschlüsse auf die neuronale Dichte im jeweiligen Segment zu. Die verschiedenen Muster der GCP wurden qualitativ erfasst.

Bei einem Drittel der epileptischen Katzen wurden mit HS kompatible Veränderungen im Pyramidenzellband festgestellt. Am häufigsten war feline Hippokampussklerose (fHS) mit entzündlichen Gehirnerkrankungen assoziiert. Bezüglich der Anfallsart hatten Tiere mit primär generalisierten

Anfällen und sekundärem Status epilepticus das höchste Risiko, fHS zu entwickeln (mit 41,9% und 22,6% betroffenen Tieren respektive). Unabhängig von Anfallsart und –ätiologie, waren totale HS, sowie der Verlust in CA3 und CA4 oder CA1, CA2 und CA3 die am häufigsten gesehenen Muster von fHS.

GCP wurde bei 76,5% der epileptischen Katzen mit HS, 53,4% der Epileptiker ohne HS und bei 24,1% der Kontrolltiere gefunden. Insgesamt am häufigsten waren bei den epileptischen Tieren ektopische Körnerzellen. Die Verdickung der Körnerzellschicht (GCL) erwies sich als besonders typisch für fHS-positive Katzen, die Ausdünnung derselben war dagegen spezifisch für fHS-negative epileptische Tiere.

Schließlich lässt sich sagen, dass sich zwischen der HS der Katzen und der HS des Menschen viele Parallelen ziehen lassen, wobei es aber auch wichtige Unterschiede gibt. Die speziesspezifischen Besonderheiten, insbesondere in der segmentalen Ausprägung, wurden in der in dieser Studie vorgeschlagenen Einteilung für fHS berücksichtigt.

## VII. SUMMARY

### **Investigation of specific hippocampal lesion patterns in epileptic cats**

By Eva Katharina Wagner

This study was launched to analyze hippocampal pathology in epileptic cats and elucidate the occurrence and characteristics of hippocampal sclerosis (HS) and granule-cell pathology (GCP). Additionally, analogies to human HS were drawn under consideration of species-specific peculiarities.

The brains from a total of 93 cats with clinically documented seizures were investigated and underwent a detailed histopathological revision. An age and sex-matched control-group was examined the same way.

The brains were cut at the level of the temporo-ventral hippocampal body. The slides were then analyzed using standardized algorithms from human medicine. Using digital Image analysis software, the interneurononuclear-distance (INND) between the pyramidal cells of the cornu-ammonis-segments (CA) 1 to CA 4 and between the granule cells of the dentate gyrus was measured. This parameter allowed conclusions on the neuronal density in each segment. The different patterns of GCP were assessed qualitatively.

Changes to the pyramidal cell band compatible with HS were found in about one third of the epileptic cats. Feline hippocampal sclerosis (fHS) was most commonly associated with inflammatory brain diseases. Regarding seizure-type, animals with primary generalized seizures and secondary status epilepticus had the highest risk for developing fHS (with 41.9% and 22.6% affected animals respectively). Independent of seizure type or aetiology, the most commonly seen patterns of fHS were total HS, loss in CA3 and CA4 or a combination of CA1, CA2 and CA3.

GCP was recorded in 76.5% of epileptic cats with HS, in 53.4% of non-HS epileptics and in 24.1% of control-animals. Generally, ectopic granule-cells

were the most frequent pathologic finding in epileptic animals. Thickening of the granule-cell-layer (GCL) was found to be typical for fHS-positive cats, while a thinning of the GCL was specific for fHS-negative epileptic animals.

In summary it can be said, that many parallels can be drawn between human and feline HS, even though there also are some important differences. Species-specific characteristics, especially regarding the segmental patterns, were incorporated to the grading-scheme for fHS proposed in this study.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Alfaro JM, Ripoll-Gomez J, Burgos JS. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. *Eur J Neurosci* 2011; 33: 1252-5.

Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 1989; 31: 571-91.

Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 2007; 163: 3-22.

Andersen P, Bliss TV, Skrede KK. Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res* 1971; 13: 222-38.

Andersen P, Soleng AF, Raastad M. The hippocampal lamella hypothesis revisited. *Brain Res* 2000; 886: 165-71.

Anonymous. Health topics: Epilepsy. World Health Organization, Avenue Appia 20, 1211 Geneva 27, Switzerland 2014a: <http://www.who.int/topics/epilepsy/en/>.

Anonymous. International League Against Epilepsy. International League Against Epilepsy, Headquarters, 342 North Main Street, West Hartford, CT 06117-2507, USA 2014b: [www.ilae.org](http://www.ilae.org).

Azakli H, Gurses C, Arikan M, Aydoseli A, Aras Y, Sencer A, Gokyigit A, Bilgic B, Ustek D. Whole mitochondrial DNA variations in hippocampal surgical specimens and blood samples with high-throughput sequencing: a case of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Gene* 2013; 529: 190-4.



Bandopadhyay R, Liu JY, Sisodiya SM, Thom M. A comparative study of the dentate gyrus in hippocampal sclerosis in epilepsy and dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014; 40: 177-90.

Baraban SC, Taylor MR, Castro PA, Baier H. Pentylenetetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 2005; 131: 759-68.

Barnes HL, Chrisman CL, Mariani CL, Sims M, Alleman AR. Clinical signs, underlying cause, and outcome in cats with seizures: 17 cases (1997-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2004; 225: 1723-6.

Berendt M, Gram L. Epilepsy and seizure classification in 63 dogs: a reappraisal of veterinary epilepsy terminology. *J Vet Intern Med* 1999; 13: 14-20.

Berendt M, Gullov CH, Fredholm M. Focal epilepsy in the Belgian shepherd: evidence for simple Mendelian inheritance. *J Small Anim Pract* 2009; 50: 655-61.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshe SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010; 51: 676-85.

Bernard C, Wheal HV. Model of local connectivity patterns in CA3 and CA1 areas of the hippocampus. *Hippocampus* 1994; 4: 497-529.

Blumcke I, Thom M, Wiestler OD. Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* 2002; 12: 199-211.

Blumcke I, Pauli E, Clusmann H, Schramm J, Becker A, Elger C, Merschhemke M, Meencke HJ, Lehmann T, von Deimling A, Scheiwe C, Zentner J, Volk B, Romstock J, Stefan H, Hildebrandt M. A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta Neuropathol* 2007; 113: 235-44.

Blumcke I, Kistner I, Clusmann H, Schramm J, Becker AJ, Elger CE, Bien CG, Merschhemke M, Meencke HJ, Lehmann T, Buchfelder M, Weigel D, Buslei R, Stefan H, Pauli E, Hildebrandt M. Towards a clinico-pathological classification of granule cell dispersion in human mesial temporal lobe epilepsies. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 535-44.

Blumcke I, Cross JH, Spreafico R. The international consensus classification for hippocampal sclerosis: an important step towards accurate prognosis. *Lancet Neurol* 2013a; 12: 844-6.

Blumcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, Bernasconi N, Bien CG, Cendes F, Coras R, Cross JH, Jacques TS, Kahane P, Mathern GW, Miyata H, Moshe SL, Oz B, Ozkara C, Perucca E, Sisodiya S, Wiebe S, Spreafico R. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia* 2013b; 54: 1315-29.

Bone B, Fogarasi A, Schulz R, Gyimesi C, Kalmar Z, Kovacs N, Ebner A, Janszky J. Secondly generalized seizures in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2012; 53: 817-24.

Borschensky CM, Woolley JS, Kipar A, Herden C. Neurogenesis in a young dog with epileptic seizures. *Vet Pathol* 2012; 49: 766-70.

Bouchet C, Cazauvieilh, CA De l'épilepsie considérée dans ses rapports avec l'aliénation mentale. Recherche sur la nature et le siège de ces deux maladies. *Arch Gen Med* 1825: 510 - 42.

Briellmann RS, Kalnins RM, Berkovic SF, Jackson GD. Hippocampal pathology in refractory temporal lobe epilepsy: T2-weighted signal change reflects dentate gliosis. *Neurology* 2002; 58: 265-71.

Brini E, Gandini G, Crescio I, Fatzer R, Casalone C. Necrosis of hippocampus and piriform lobe: clinical and neuropathological findings in two Italian cats. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 377-81.

Buckmaster PS, Smith MO, Buckmaster CL, LeCouteur RA, Dudek FE. Absence of temporal lobe epilepsy pathology in dogs with medically intractable epilepsy. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 95-9.

Caboclo LO, Neves RS, Jardim AP, Hamad AP, Centeno RS, Lancellotti CL, Scorza CA, Cavalheiro EA, Yacubian EM, Sakamoto AC. Surgical and postmortem pathology studies: contribution for the investigation of temporal lobe epilepsy. *Arq Neuropsiquiatr* 2012; 70: 945-52.

Calvo JM, Fernandez-Mas R. Transitory and short-duration changes of sleep organization provoked by amygdaloid kindling in the cat: a daily 23-hour sleep recording study. *Epilepsy Res* 1994; 19: 1-13.

Cascino GD, Jack CR, Parisi JE, Sharbrough FW, Hirschorn KA, Meyer FB, Marsh WR, O'Brien PC. Magnetic resonance imaging-based volume studies in temporal lobe epilepsy: Pathological correlations. *Ann Neurol* 1991; 30: 31-6.

Cavalheiro EA, Riche DA, Le Gal La Salle G. Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: A method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1982; 53: 581-9.

Cavazos JE, Sutula TP. Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Res* 1990; 527: 1-6.

Cavazos JE, Golarai G, Sutula TP. Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J Neurosci* 1991; 11: 2795-803.

Cavazos JE, Das I, Sutula TP. Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *J Neurosci* 1994; 14: 3106-21.

Caviness VS, Jr. Time of neuron origin in the hippocampus and dentate gyrus of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J Comp Neurol* 1973; 151: 113-20.

Cha BH, Akman C, Silveira DC, Liu X, Holmes GL. Spontaneous recurrent seizure following status epilepticus enhances dentate gyrus neurogenesis. *Brain Dev* 2004; 26: 394-7.

Chevalleyre V, Siegelbaum SA. Strong CA2 Pyramidal Neuron Synapses Define a Powerful Disynaptic Cortico-Hippocampal Loop. *Neuron* 2010; 66: 560-72.

Cohen-Gadol AA, Pan JW, Kim JH, Spencer DD, Hetherington HH. Mesial temporal lobe epilepsy: a proton magnetic resonance spectroscopy study and a histopathological analysis. *J Neurosurg* 2004; 101: 613-20.

Conner JM, Muir D, Varon S, Hagg T, Manthorpe M. The localization of nerve growth factor-like immunoreactivity in the adult rat basal forebrain and hippocampal formation. *J Comp Neurol* 1992; 319: 454-62.

Coras R, Siebzehntrubl FA, Pauli E, Huttner HB, Njunting M, Kobow K, Villmann C, Hahnen E, Neuhuber W, Weigel D, Buchfelder M, Stefan H, Beck H, Steindler DA, Blumcke I. Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain* 2010; 133: 3359-72.

Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 2008; 172: 143-57.

De Risio L, Brown R, Tennant B, Sparkes A, Matiassek L, de Stefani A, Weissenbock H, Matiassek K. Slowly progressive lymphohistiocytic meningoencephalomyelitis in 21 adult cats presenting with peculiar neurological signs. *J Feline Med Surg* 2012; 14: 250-6.

Delgado JR, Sevillano M. Evolution of repeated hippocampal seizures in the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1961; 13: 722-33.

Deller T, Martinez A, Nitsch R, Frotscher M. A novel entorhinal projection to the rat dentate gyrus: direct innervation of proximal dendrites and cell bodies of granule cells and GABAergic neurons. *J Neurosci* 1996; 16: 3322-33.

Dent JA, Galvin NJ, Stanfield BB, Cowan WM. The mode of termination of the hypothalamic projection to the dentate gyrus: an EM autoradiographic study. *Brain Res* 1983; 258: 1-10.

Dickson DW, Davies P, Bevona C, Van Hoesven KH, Factor SM, Grober E, Aronson MK, Crystal HA. Hippocampal sclerosis: a common pathological feature of dementia in very old (> or = 80 years of age) humans. *Acta Neuropathol* 1994; 88: 212-21.

El Bahh B, Lespinet V, Lurton D, Coussemacq M, Le Gal La Salle G, Rougier A. Correlations between granule cell dispersion, mossy fiber sprouting, and hippocampal cell loss in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1999; 40: 1393-401.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; 4: 1313-7.

Fahrner A, Kann G, Flubacher A, Heinrich C, Freiman TM, Zentner J, Frotscher M, Haas CA. Granule cell dispersion is not accompanied by enhanced neurogenesis in temporal lobe epilepsy patients. *Exp Neurol* 2007; 203: 320-32.

Fatzner R, Gandini G, Jaggy A, Doherr M, Vandeveld M. Necrosis of hippocampus and piriform lobe in 38 domestic cats with seizures: a retrospective study on clinical and pathologic findings. *J Vet Intern Med* 2000; 14: 100-4.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J, Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005; 46: 470-2.

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Jr., Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshe SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55: 475-82.

Franklin PH, Tripp ED, Zhang G, Gale K, Murray TF. Adenosine receptor activation blocks seizures induced by bicuculline methiodide in the rat prepiriform cortex. *Eur J Pharmacol* 1988; 150: 207-9.

French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, Spencer DD. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol* 1993; 34: 774-80.

French JA, White HS, Klitgaard H, Holmes GL, Privitera MD, Cole AJ, Quay E, Wiebe S, Schmidt D, Porter RJ, Arzimanoglou A, Trinka E, Perucca E. Development of new treatment approaches for epilepsy: unmet needs and opportunities. *Epilepsia* 2013; 54 Suppl 4: 3-12.

Galanopoulou AS, Kokaia M, Loeb JA, Nehlig A, Pitkanen A, Rogawski MA, Staley KJ, Whittemore VH, Edward Dudek F. Epilepsy therapy development: technical and methodologic issues in studies with animal models. *Epilepsia* 2013; 54 Suppl 4: 13-23.

Gastaut H, Naquet R, Meyer A, Cavanagh JB, Beck E. Experimental psychomotor epilepsy in the cat; electro-clinical and anatomo-pathological correlations. *J Neuropathol Exp Neurol* 1959a; 18: 270-93.

Gastaut H, Toga M, Roger J, Gibson WC. A Correlation of Clinical, Electroencephalographic and Anatomical Findings in Nine Autopsied Cases of "Temporal Lobe Epilepsy". *Epilepsia* 1959b; 1: 56-85.

Goddard GV. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* 1967; 214: 1020-1.

Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 1969; 25: 295-330.

Gurses C, Azakli H, Alptekin A, Cakiris A, Abaci N, Arikan M, Kursun O, Gokyigit A, Ustek D. Mitochondrial DNA profiling via genomic analysis in mesial temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis. *Gene* 2014; 538: 323-7.

Hasegawa D, Orima H, Fujita M, Hashizume K, Tanaka T. Complex partial status epilepticus induced by a microinjection of kainic acid into unilateral amygdala in dogs and its brain damage. *Brain Res* 2002; 955: 174-82.

Hasegawa D, Orima H, Fujita M, Nakamura S, Takahashi K, Ohkubo S, Igarashi H, Hashizume K. Diffusion-weighted imaging in kainic acid-induced complex partial status epilepticus in dogs. *Brain Res* 2003; 983: 115-27.

He S, Wang Q, He J, Pu H, Yang W, Ji J. Proteomic analysis and comparison of the biopsy and autopsy specimen of human brain temporal lobe. *PROTEOMICS* 2006; 6: 4987-96.

Hitti FL, Siegelbaum SA. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature* 2014; 508: 88-92.

Hjorth-Simonsen A, Jeune B. Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J Comp Neurol* 1972; 144: 215-32.

Hortopan GA, Dinday MT, Baraban SC. Spontaneous seizures and altered gene expression in GABA signaling pathways in a mind bomb mutant zebrafish. *J Neurosci* 2010; 30: 13718-28.

Horvath RA, Fogarasi A, Schulz R, Perlaki G, Kalmar Z, Toth V, Kovacs N, Ebner A, Janszky J. Ictal vocalizations occur more often in temporal lobe epilepsy with dominant (left-sided) epileptogenic zone. *Epilepsia* 2009; 50: 1542-6.

Houser CR. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 1990; 535: 195-204.

Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR, Delgado-Escueta AV. Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J Neurosci* 1990; 10: 267-82.

Hulsmeyer V, Zimmermann R, Brauer C, Sauter-Louis C, Fischer A. Epilepsy in Border Collies: clinical manifestation, outcome, and mode of inheritance. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 171-8.

Ibata Y, Otsuka N. Electron microscopic demonstration of zinc in the



hippocampal formation using Timm's sulfide silver technique. *J Histochem Cytochem* 1969; 17: 171-5.

Ino T, Kaneko T, Mizuno N. Direct projections from the entorhinal cortical layers to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex in the cat. *Neurosci Res* 1998; 32: 241-65.

Ino T, Kaneko T, Mizuno N. Projections from the hippocampal and parahippocampal regions to the entorhinal cortex. An anterograde and retrograde tract-tracing study in the cat. *Neurosci Res* 2001; 39: 51-69.

Irle E, Markowitsch HJ. Widespread cortical projections of the hippocampal formation in the cat. *Neuroscience* 1982; 7: 2637-47.

Jardim AP, Neves RS, Caboclo LO, Lancellotti CL, Marinho MM, Centeno RS, Cavalheiro EA, Scorza CA, Yacubian EM. Temporal lobe epilepsy with mesial temporal sclerosis: hippocampal neuronal loss as a predictor of surgical outcome. *Arq Neuropsiquiatr* 2012; 70: 319-24.

Jefferys JG. Hippocampal sclerosis and temporal lobe epilepsy: cause or consequence? *Brain* 1999; 122 ( Pt 6): 1007-8.

Jessberger S, Romer B, Babu H, Kempermann G. Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells. *Exp Neurol* 2005; 196: 342-51.

Johnston GA, Curtis DR, Davies J, McCulloch RM. Spinal interneurone excitation by conformationally restricted analogues of L-glutamic acid. *Nature* 1974; 248: 804-5.

Jokinen TS, Metsähonkala L, Bergamasco L, Viitmaa R, Syrjä P, Lohi H, Snellman M, Jeserevics J, Cizinauskas S. Benign familial juvenile epilepsy in Lagotto Romagnolo dogs. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 464-71.

Jones MW, McHugh TJ. Updating hippocampal representations: CA2 joins the circuit. *Trends in Neurosciences* 2011; 34: 526-35.

Kan AA, van Erp S, Derijck AA, de Wit M, Hessel EV, O'Duibhir E, de Jager W, Van Rijen PC, Gosselaar PH, de Graan PN, Pasterkamp RJ. Genome-wide microRNA profiling of human temporal lobe epilepsy identifies modulators of the immune response. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 3127-45.

Kaplan BJ, Seyfried TN, Glaser GH. Spontaneous polyspike discharges in an epileptic mutant mouse (tottering). *Exp Neurol* 1979; 66: 577-86.

Klang A, Thaller D, Schmidt P, Kovacs GG, Halasz P, Pakozdy A. Bilateral Dentate Gyrus Structural Alterations in a Cat Associated With Hippocampal Sclerosis and Intraventricular Meningioma. *Vet Pathol* 2015;

Kline KL. Feline epilepsy. *Clin Tech Small Anim Pract* 1998; 13: 152-8.

Kohara K, Pignatelli M, Rivest AJ, Jung H-Y, Kitamura T, Suh J, Frank D, Kajikawa K, Mise N, Obata Y, Wickersham IR, Tonegawa S. Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nat Neurosci* 2014; 17: 269-79.

Kohler C. Intrinsic projections of the retrohippocampal region in the rat brain. I. The subicular complex. *J Comp Neurol* 1985; 236: 504-22.

Kuwabara T, Hasegawa D, Kobayashi M, Fujita M, Orima H. Clinical magnetic resonance volumetry of the hippocampus in 58 epileptic dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 2010a; 51: 485-90.

Kuwabara T, Hasegawa D, Ogawa F, Kobayashi M, Fujita M, Suzuki H, Matsuki N, Orima H. A familial spontaneous epileptic feline strain: a novel model of idiopathic/genetic epilepsy. *Epilepsy Res* 2010b; 92: 85-8.

Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 1990; 14: 511-7.

Lencz T, McCarthy G, Bronen RA, Scott TM, Inserni JA, Sass KJ, Novelly RA, Kim JH, Spencer DD. Quantitative magnetic resonance imaging in temporal lobe epilepsy: Relationship to neuropathology and neuropsychological function. *Ann Neurol* 1992; 31: 629-37.

Lewis DV, Shinnar S, Hesdorffer DC, Bagiella E, Bello JA, Chan S, Xu Y, MacFall J, Gomes WA, Moshe SL, Mathern GW, Pellock JM, Nordli DR, Jr., Frank LM, Provenzale J, Shinnar RC, Epstein LG, Masur D, Litherland C, Sun S. Hippocampal sclerosis after febrile status epilepticus: the FEBSTAT study. *Ann Neurol* 2014; 75: 178-85.

Liu X-Y, Yang J-L, Chen L-J, Zhang Y, Yang M-L, Wu Y-Y, Li F-Q, Tang M-H, Liang S-F, Wei Y-Q. Comparative proteomics and correlated signaling network of rat hippocampus in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *PROTEOMICS* 2008; 8: 582-603.

Loscher W, Jackel R, Czuczwar SJ. Is amygdala kindling in rats a model for drug-resistant partial epilepsy? *Exp Neurol* 1986; 93: 211-26.

Loscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2002; 50: 105-23.

Loscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 2011; 20: 359-68.

Lurton D, El Bahh B, Sundstrom L, Rougier A. Granule cell dispersion is correlated with early epileptic events in human temporal lobe epilepsy. *J Neurol Sci* 1998; 154: 133-6.

Magloczky Z, Acsady L, Freund TF. Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus* 1994; 4: 322-34.

Magloczky Z, Wittner L, Borhegyi Z, Halasz P, Vajda J, Czirjak S, Freund TF. Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 2000; 96: 7-25.

Mankin EA, Diehl GW, Sparks FT, Leutgeb S, Leutgeb JK. Hippocampal CA2 Activity Patterns Change over Time to a Larger Extent than between Spatial Contexts. *Neuron* 2015; 85: 190-201.

Margerison JH, Corsellis JA. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain* 1966; 89: 499-530.

Mathern GW, Babb TL, Vickrey BG, Melendez M, Pretorius JK. The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain* 1995; 118 ( Pt 1): 105-18.

Mathern GW, Kuhlman PA, Mendoza D, Pretorius JK. Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 199-212.

McNamara JO. Kindling: an animal model of complex partial epilepsy. *Ann Neurol* 1984; 16 Suppl: S72-6.

Meencke HJ, Janz D. Neuropathological findings in primary generalized epilepsy: a study of eight cases. *Epilepsia* 1984; 25: 8-21.

Mellema LM, Koblik PD, Kortz GD, LeCouteur RA, Chechowicz MA, Dickinson PJ. Reversible magnetic resonance imaging abnormalities in dogs following seizures. *Vet Radiol Ultrasound* 1999; 40: 588-95.

Meyer A, Falconer MA, Beck E. Pathological findings in temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1954; 17: 276-85.

Millan MH, Meldrum BS, Faingold CL. Induction of audiogenic seizure susceptibility by focal infusion of excitant amino acid or bicuculline into the inferior colliculus of normal rats. *Exp Neurol* 1986; 91: 634-9.

Mosko S, Lynch G, Cotman CW. The distribution of septal projections to the hippocampus of the rat. *J Comp Neurol* 1973; 152: 163-74.

Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 1978; 271: 676-7.

Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. *Brain Res* 1980; 182: 1-9.

Nakahara H, Konishi Y, Beach TG, Yamada N, Makino S, Tooyama I. Infiltration of T lymphocytes and expression of icam-1 in the hippocampus of patients with hippocampal sclerosis. *Acta Histochem Cytochem* 2010; 43: 157-62.

Nelson PT, Schmitt FA, Lin Y, Abner EL, Jicha GA, Patel E, Thomason PC, Neltner JH, Smith CD, Santacruz KS, Sonnen JA, Poon LW, Gearing M, Green RC, Woodard JL, Van Eldik LJ, Kryscio RJ. Hippocampal sclerosis in advanced age: clinical and pathological features. *Brain* 2011; 134: 1506-18.

Ochiishi T, Saitoh Y, Yukawa A, Saji M, Ren Y, Shirao T, Miyamoto H, Nakata H, Sekino Y. High level of adenosine A1 receptor-like immunoreactivity in the CA2/CA3a region of the adult rat hippocampus. *Neuroscience* 1999; 93: 955-67.

Pakozdy A, Leschnik M, Sarchahi AA, Tichy AG, Thalhammer JG. Clinical comparison of primary versus secondary epilepsy in 125 cats. *J Feline Med Surg* 2010; 12: 910-6.

Pakozdy A, Gruber A, Kneissl S, Leschnik M, Halasz P, Thalhammer JG. Complex partial cluster seizures in cats with orofacial involvement. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 687-93.

Pakozdy A, Sarchahi AA, Leschnik M, Tichy AG, Halasz P, Thalhammer JG. Treatment and long-term follow-up of cats with suspected primary epilepsy. *J Feline Med Surg* 2013a; 15: 267-73.

Pakozdy A, Halasz P, Klang A, Bauer J, Leschnik M, Tichy A, Thalhammer JG, Lang B, Vincent A. Suspected limbic encephalitis and seizure in cats associated with voltage-gated potassium channel (VGKC) complex antibody. *J Vet Intern Med* 2013b; 27: 212-4.

Pakozdy A, Halasz P, Klang A. Epilepsy in cats: theory and practice. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 255-63.

Parent JM, Quesnel AD. Seizures in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1996; 26: 811-25.

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 1997; 17: 3727-38.

Parent JM, Kron MM. Neurogenesis and Epilepsy. In: Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, 4th edn. Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, eds. Bethesda (MD): Michael A Rogawski, Antonio V Delgado-Escueta, Jeffrey L Noebels, Massimo Avoli and Richard W Olsen. 2012:

Pauli E, Hildebrandt M, Romstock J, Stefan H, Blumcke I. Deficient memory acquisition in temporal lobe epilepsy is predicted by hippocampal granule cell loss. *Neurology* 2006; 67: 1383-9.

Potschka H. Animal and human data: where are our concepts for drug-resistant epilepsy going? *Epilepsia* 2013; 54 Suppl 2: 29-32.

Potschka H, Fischer A, von Ruden EL, Hulsmeier V, Baumgartner W. Canine epilepsy as a translational model? *Epilepsia* 2013; 54: 571-9.

Proper EA, Jansen GH, van Veelen CW, van Rijen PC, Gispen WH, de Graan PN. A grading system for hippocampal sclerosis based on the degree of hippocampal mossy fiber sprouting. *Acta Neuropathol* 2001; 101: 405-9.

Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32: 281-94.

Reigel CE, Dailey JW, Jobe PC. I. The genetically epilepsy-prone rat: An overview of seizure-prone characteristics and responsiveness to anticonvulsant drugs. *Life Sciences* 1986; 39: 763-74.

Represa A, Le Gall La Salle G, Ben-Ari Y. Hippocampal plasticity in the kindling model of epilepsy in rats. *Neurosci Lett* 1989; 99: 345-50.

Santucci V, Fournier M, Keane P, Simiand J, Michaud JC, Morre M, Biziere K. EEG effects of i.v. infusion of pentylentetrazol in rats: a model for screening and classifying antiepileptic compounds. *Psychopharmacology (Berl)* 1985; 87: 337-43.

Schmied O, Scharf G, Hilbe M, Michal U, Tomsa K, Steffen F. Magnetic resonance imaging of feline hippocampal necrosis. *Vet Radiol Ultrasound* 2008; 49: 343-9.

Schriefl S, Steinberg TA, Matiassek K, Ossig A, Fenske N, Fischer A. Etiologic classification of seizures, signalment, clinical signs, and outcome in cats with seizure disorders: 91 cases (2000-2004). *J Am Vet Med Assoc* 2008; 233: 1591-7.

Schwartz IR, Broggi G, Pappas GD. Fine structure of cat hippocampus during sustained seizure. *Brain Res* 1970; 18: 176-80.

Sendrowski K, Sobaniec W. Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. *Pharmacol Rep* 2013; 65: 555-65.

Shihab N, Bowen J, Volk HA. Behavioral changes in dogs associated with the development of idiopathic epilepsy. *Epilepsy Behav* 2011; 21: 160-7.

Shouse MN, Staba RJ, Saquib SF, Farber PR. Long-lasting effects of feline amygdala kindling on monoamines, seizures and sleep. *Brain Res* 2001; 892: 147-65.



Simonato M, Brooks-Kayal AR, Engel Jr J, Galanopoulou AS, Jensen FE, Moshé SL, O'Brien TJ, Pitkanen A, Wilcox KS, French JA. The challenge and promise of anti-epileptic therapy development in animal models. *The Lancet Neurology* 2014; 13: 949-60.

Sloviter RS. A simplified Timm stain procedure compatible with formaldehyde fixation and routine paraffin embedding of rat brain. *Brain Res Bull* 1982; 8: 771-4.

Sloviter RS. "Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I. Acute electrophysiological and light microscopic studies. *Brain Research Bulletin* 1983; 10: 675-97.

Sloviter RS, Sollas AL, Barbaro NM, Laxer KD. Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J Comp Neurol* 1991; 308: 381-96.

Sloviter RS. Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Neurosci Lett* 1992; 137: 91-6.

Sloviter RS, Bumanglag AV, Schwarcz R, Frotscher M. Abnormal dentate gyrus network circuitry in temporal lobe epilepsy. In: *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, eds. Bethesda MD: Michael A Rogawski, Antonio V Delgado-Escueta, Jeffrey L Noebels, Massimo Avoli and Richard W Olsen. 2012:

Sloviter RS, Bumanglag AV. Defining "epileptogenesis" and identifying "antiepileptogenic targets" in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. *Neuropharmacology* 2013; 69: 3-15.

Spencer SS. When should temporal-lobe epilepsy be treated surgically? *Lancet Neurol* 2002; 1: 375-82.

Steinmetz S, Tipold A, Loscher W. Epilepsy after head injury in dogs: a natural model of posttraumatic epilepsy. *Epilepsia* 2013; 54: 580-8.

Steward O, Scoville SA. Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J Comp Neurol* 1976; 169: 347-70.

Stewart AM, Desmond D, Kyzar E, Gaikwad S, Roth A, Riehl R, Collins C, Monnig L, Green J, Kalueff AV. Perspectives of zebrafish models of epilepsy: What, how and where next? *Brain Research Bulletin* 2012; 87: 135-43.

Swanson LW. The anatomical organization of septo-hippocampal projections. *Ciba Found Symp* 1977: 25-48.

Swinyard EA, Brown WC, Goodman LS. Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1952; 106: 319-30.

Tamamaki N, Nojyo Y. Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus* 1993; 3: 471-80.

Tanaka T, Naquet R. Kindling effect and sleep organization in cats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1975; 39: 449-54.

Tanaka T, Kaijima M, Daita G, Ohgami S, Yonemasu Y, Riche D. Electroclinical features of kainic acid-induced status epilepticus in freely moving cats. Microinjection into the dorsal hippocampus. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1982; 54: 288-300.

Tanaka T, Kaijima M, Yonemasu Y, Cepeda C. Spontaneous secondarily generalized seizures induced by a single microinjection of kainic acid into unilateral amygdala in cats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1985; 61: 422-9.

Tasch E, Cendes F, Li LM, Dubeau F, Andermann F, Arnold DL. Neuroimaging evidence of progressive neuronal loss and dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1999; 45: 568-76.

Tellez-Zenteno JF, Hernandez-Ronquillo L. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Treat* 2012; 2012: 630853.

Thom M, Sisodiya SM, Beckett A, Martinian L, Lin WR, Harkness W, Mitchell TN, Craig J, Duncan J, Scaravilli F. Cytoarchitectural abnormalities in hippocampal sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 510-9.

Thom M, Zhou J, Martinian L, Sisodiya S. Quantitative post-mortem study of the hippocampus in chronic epilepsy: seizures do not inevitably cause neuronal loss. *Brain* 2005; 128: 1344-57.

Thom M, Eriksson S, Martinian L, Caboclo LO, McEvoy AW, Duncan JS, Sisodiya SM. Temporal lobe sclerosis associated with hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: neuropathological features. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009a; 68: 928-38.

Thom M. Hippocampal sclerosis: progress since Sommer. *Brain Pathol* 2009; 19: 565-72.

Thom M, Martinian L, Catarino C, Yogarajah M, Koepp MJ, Caboclo L, Sisodiya SM. Bilateral reorganization of the dentate gyrus in hippocampal sclerosis: a postmortem study. *Neurology* 2009b; 73: 1033-40.

Thom M, Liagkouras I, Elliot KJ, Martinian L, Harkness W, McEvoy A, Caboclo LO, Sisodiya SM. Reliability of patterns of hippocampal sclerosis as predictors of postsurgical outcome. *Epilepsia* 2010; 51: 1801-8.

Thom M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014; 40: 520-43.

Thompson ME, Galosy RA. Electrical brain activity and cardiovascular function during amygdaloid kindling in the dog. *Exp Neurol* 1983; 82: 505-20.

Tucker MS, Khan I, Fuchs-Young R, Price S, Steininger TL, Greene G, Wainer BH, Rosner MR. Localization of immunoreactive epidermal growth factor receptor in neonatal and adult rat hippocampus. *Brain Res* 1993; 631: 65-71.

Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 1983; 9: 315-35.

Van Groen T, Da Silva FHL. Septotemporal distribution of entorhinal projections to the hippocampus in the cat: Electrophysiological evidence. *J Comp Neurol* 1985; 238: 1-9.

Van Groen T, Da Silva FHL. Organization of the reciprocal connections between the subiculum and the enthorhinal cortex in the cat: II. An electrophysiological study. *J Comp Neurol* 1986; 251: 111-20.

van Groen T, van Haren FJ, Witter MP, Groenewegen HJ. The organization of the reciprocal connections between the subiculum and the entorhinal cortex in the cat: I. A neuroanatomical tracing study. *J Comp Neurol* 1986; 250: 485-97.

van Groen T, Wyss M. Species differences in hippocampal commissural connections: Studies in rat, guinea pig, rabbit, and cat. *J Comp Neurol* 1988; 267: 322-34.

Van Paesschen W, Revesz T, Duncan JS, King MD, Connelly A. Quantitative neuropathology and quantitative magnetic resonance imaging of the hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1997; 42: 756-66.

van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10: 272-82.

Vanhaesebrouck AE, Posch B, Baker S, Plessas IN, Palmer AC, Constantino-Casas F. Temporal lobe epilepsy in a cat with a pyriform lobe oligodendroglioma and hippocampal necrosis. *J Feline Med Surg* 2012; 14: 932-7.

Vertes RP. PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 1992; 326: 595-622.

Vicedomini JP, Nadler JV. A model of status epilepticus based on electrical stimulation of hippocampal afferent pathways. *Exp Neurol* 1987; 96: 681-91.

von Ruden EL, Avemary J, Zellinger C, Algermissen D, Bock P, Beineke A, Baumgartner W, Stein VM, Tipold A, Potschka H. Distemper virus encephalitis exerts detrimental effects on hippocampal neurogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012; 38: 426-42.

Wada Y, Minabe Y, Okuda H, Jibiki I, Yoshida K, Yamaguchi N. Lateral geniculate kindling and long-lasting photosensitivity in cats. *Exp Neurol* 1986a; 91: 343-54.

Wada Y, Okuda H, Yamaguchi N, Yoshida K. Effects of allylglycine on photosensitivity in the lateral geniculate-kindled cat. *Exp Neurol* 1986b; 94: 228-36.

Wagner E, Rosati M, Molin J, Foitzik U, Wahle AM, Fischer A, Matiassek LA, Reese S, Flegel T, Matiassek K. Hippocampal sclerosis in feline epilepsy. *Brain Pathol* 2014; 24: 607-19.

Wahle AM, Bruhschwein A, Matiassek K, Putschbach K, Wagner E, Mueller RS, Fischer A. Clinical characterization of epilepsy of unknown cause in cats. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 182-8.

Watson C, Nielsen SL, Cobb C, Burgerman R, Williamson B. Pathological grading system for hippocampal sclerosis: correlation with magnetic resonance imaging-based volume measurements of the hippocampus. *Journal of Epilepsy* 1996; 9: 56-64.

Wauquier A, Ashton D, Melis W. Behavioral analysis of amygdaloid kindling in beagle dogs and the effects of clonazepam, diazepam, phenobarbital, diphenylhydantoin, and flunarizine on seizure manifestation. *Exp Neurol* 1979; 64: 579-86.

Wenzel HJ, Cole TB, Born DE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD. Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 12676-81.

Wieser HG. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 2004; 45: 695-714.

Williamson A, Spencer DD. Electrophysiological characterization of CA2 pyramidal cells from epileptic humans. *Hippocampus* 1994; 4: 226-37.

Willmore LJ, Sybert GW, Munson JV, Hurd RW. Chronic focal epileptiform discharges induced by injection of iron into rat and cat cortex. *Science* 1978; 200: 1501-3.

Witter MP, Groenewegen HJ. Laminar origin and septotemporal distribution of entorhinal and perirhinal projections to the hippocampus in the cat. *Journal of Comparative Neurology* 1984; 224: 371-85.

Woodward WR, Nishi R, Meshul CK, Williams TE, Coulombe M, Eckenstein FP. Nuclear and cytoplasmic localization of basic fibroblast growth factor in astrocytes and CA2 hippocampal neurons. *J Neurosci* 1992; 12: 142-52.

Wyler AR, Curtis Dohan Jr F, Schweitzer JB, Berry Iii AD. A grading system for mesial temporal pathology (hippocampal sclerosis) from anterior temporal lobectomy. *Journal of Epilepsy* 1992; 5: 220-5.

Yamasaki H, Furuoka H, Takechi M, Itakura C. Neuronal loss and gliosis in limbic system in an epileptic dog. *Vet Pathol* 1991; 28: 540-2.

## **IX. ANHANG**

### **1. Methoden**

#### **1.1. Herstellung der Paraffinschnitte**

Das zu untersuchende Gewebe wurde standardmäßig in 10%igem gepuffertem Formalin fixiert und archiviert. Die Entwässerung der Gehirne und folgende Überführung in Paraffin erfolgte mittels eines automatischen Gewebeeinfilters.

Die Paraffinblöcke wurden anschließend von Hand ausgegossen. Die 5 µm dicken Schnitte wurden nach vorheriger Kühlung auf einer Kühlplatte, mit einem Rotationsmikrotom hergestellt. Anschließend wurden die Schnitte auf einem warmen Wasserbad gestreckt und auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Nach einem ersten Antrocknen auf einer Heizplatte, wurden die Schnitte anschließend für mindestens 12 Stunden in einen Wärmeschrank verbracht.

#### **1.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.)**

Übersichtsfärbung zur Darstellung zytoplasmatischer Bestandteile (rot) und der Zellkerne (blau).

- (1) Entparaffinierung in Xylol und Rehydrierung mittels Immersion in einer absteigenden Alkoholreihe:  
3 x 5 min in Xylol, 2 x 5 min in 100%igem Ethanol, dann jeweils 5 min in 96%, 70%, 50%, 30%igem Ethanol
- (2) Spülen in Aqua dest. für 5 min
- (3) Färbung der Kerne in Mayers Hämalaun für 5 min
- (4) Unter fließendem, heißen Wasser für 5 – 10 min Bläuen
- (5) Gegenfärbung mit Eosin – Immersion für 3 min
- (6) Zweimaliges Spülen in Aqua dest.



- (7) Entwässern mittels aufsteigender Alkoholreihe:  
Jeweils 5 min in 70% und 96%igem Ethanol und 2x5 min in 100%igem Ethanol
- (8) Immersion in Xylol für 3 x 5 min
- (9) Eindecken mit Histofluid Eindeckmittel

### 1.3. Protokoll für Immunhistochemie

#### Erster Tag:

- (1) Entparaffinierung in Xylol und Rehydrierung mittels Immersion in einer absteigenden Alkoholreihe:
- (2) 3 x 5 min in Xylol, 2 x 5 min in 100%igem Ethanol, dann jeweils 5 min in 96% und 70%igem Ethanol
- (3) Spülen in Aqua dest. 5 min
- (4) 3 x Spülen in PBS je 5 min
- (5) Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität  
mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol 30 min
- (6) 3 x Spülen in PBS je 5 min
- (7) Normal goat serum **1:20** 30 min bei RT
- (8) Primär-AK anti GFAP **1:500** über Nacht bei 4°C

#### Zweiter Tag:

- (9) Raumtemperatur 10 min
- (10) 3 x Spülen in PBS je 5 min
- (11) Sekundär-AK goat anti rabbit biotin. **1:200** 1 h bei RT
- (12) 3 x Spülen in PBS je 5 min
- (13) ABC 1 h bei RT
- (14) 3 x Spülen in PBS je 5 min
- (15) DAB ca. 1 min
- (16) Spülen in Aqua dest. 5 min
- (17) KMnO<sub>4</sub> 0,06% 15 min

- |      |  |        |
|------|--|--------|
| (18) | Spülen in Aqua dest.                   | 5 min  |
| (19) | FJC 0,0001%                            | 30 min |
| (20) | Spülen in Aqua dest.                   | 1 min  |
| (21) | Trocknen im Brutschrank                |        |
| (22) | Kurz eintauchen in Xylol               |        |
| (23) | Eindecken mit Histofluid Eindeckmittel |        |

Die Inkubation in 0,06%iger Kaliumpermanganatlösung ist für die Färbung mit FJC unerlässlich.

Da FJC alkohollöslich ist, werden die gefärbten Schnitte nicht wie üblich in einer Alkoholreihe dehydriert, sondern im Wärmeschrank getrocknet und vor dem Eindecken nur kurz in Xylol getaucht.

Zum besseren Erhalt der Fluoreszenz des FJC wurden die fertigen Präparate im Dunklen im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der mikroskopischen Untersuchung sollten die Präparate etwa 15 min auf Raumtemperatur kommen, um eine optimale Fluoreszenz zu gewährleisten.

## 2. Materialien

### 2.1. Verwendete Chemikalien

Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
DAB Tablets 10 mg fizzing buffer pH 7.0	Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dänemark
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eosin G (gelblich)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100%	VWR Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Fluoro-Jade®-C	Chemicon International, USA
Histofluid Eindeckmedium	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat, wasserfrei zur Analyse	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mayer's Hämalun	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol zur Analyse	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid zur Analyse	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Normal Goat Serum	MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland
Paraplast® Embedding Media, McCormic Scientific	Sherwood Medical Company, St. Louis, USA
Polyclonal Rabbit Anti Glial-Fibrillary-Acidic-Protein Antibody	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
VECTASTAIN® ABC Peroxidase Kit	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30% zur Analyse	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

**2.2. Verwendete Lösungen:**

- Eosin Stammlösung  
10 g Eosin G (gelblich)  
1000 ml Aqua dest.
- Eosin Gebrauchslösung:  
100 ml Eosin Stammlösung  
200 ml Aqua dest.  
1 ml 100%ige Essigsäure
- Phosphate-Buffered-Saline (PBS)-Puffer (pH 7,0 – 7,6)  
7,4 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat  
36,0 g Natriumchlorid  
2,15 g Kaliumhydrogenphosphat  
unter Rühren in 5,0 l Aqua dest. Lösen
- VECTASTAIN® ABC-Kit (Vector Laboratories INC.):  
5 ml PBS-Puffer  
1 Tropfen Lösung A  
1 Tropfen Lösung B
- 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)-Lösung  
1 Tablette DAB  
10,0 ml PBS-Puffer

## Filtern

In je 1ml Portionen tiefgefroren aufbewahren

Vor Gebrauch wird das DAB bei Raumtemperatur aufgetaut und pro ml mit 1,0 µl 30%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt.

- Fluoro-Jade® C Stammlösung:

1mg Fluoro-Jade® C-Puder

10 ml Aqua dest.

- Fluoro-Jade® C Gebrauchslösung:

2,5 ml Stammlösung

247,5 ml 0,1%ige Essigsäure

## 2.3. Verwendete Geräte

Automatische Gewebeeinfiltration	Leica Biosystems GmbH,
Leica TP1020	Nussloch, Deutschland
Heizplatte	MEDAX GmbH & Co.KG, Kiel,
	Deutschland
Kühlplatte	Intermed Oy, Vantaa, Finland
Mikroskop Zeiss Axiophot 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH,
	Göttingen, Deutschland
Mikroskopkamera Leica DFC 295	Leica Biosystems GmbH,
	Nussloch, Deutschland
Objektträger Star Frost adhesive	Engelbrecht Medizin- und
	Labortechnik, Edermünde,
	Deutschland
Wärmeschrank	Memmert GmbH + Co. KG,
	Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Kunz Instruments AB,
	Nynashamn, Schweden

## 2.4. Verwendete Software

### Bildanalyse:

- Leica Firecam 3.4.1 ©2006 – 2009 Leica Microsystems Switzerland
- Fiji image 1.47 i (<http://fiji.sc/Fiji>) Fiji hat eine open-source Lizenz, die unter der GNU General Public Licence läuft (<http://www.gnu.org/licenses/gpl.html>)

### Bildbearbeitung:

- Gnu Image Manipulation Program (GIMP) 2.8 (<http://www.gimp.org/>) GIMP hat eine open-source Lizenz, die unter der GNU General Public Licence läuft (<http://www.gnu.org/licenses/gpl.html>)

### Statistik:

- PAST Version 2.0, Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo. Copyright Hammer and Harper 1999 – 2011 (<http://folk.uio.no/ohammer/past>)
- GraphPad PRISM (GraphPad Software INC.)

## **X. DANKSAGUNG**

Als erstes danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Kaspar Matiassek für die Überlassung des Themas, für den überaus netten und kollegialen Umgang und für die Möglichkeit immer alle Fragen offen ansprechen zu können. Danke auch für das mir entgegengebrachte Vertrauen und für die Möglichkeit, mich in der Gestaltung dieser Arbeit auch selbst entfalten zu können und daran zu wachsen.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Dr. Marco Rosati. Danke, dass du mir immer mit Rat und Tat zur Seite standst und mich mit viel Geduld und guter Laune unterstützt hast.

Außerdem danke ich herzlich Frau Karin Stingl, die mir zusammen mit Marco die Kunst der Immunhistochemie beigebracht hat und immer auf alle meine Fragen im Labor eine Antwort hatte.

Danke auch an Frau Milanca Pelic für die Unterstützung bei der Suche nach Archivmaterial.

Dem ganzen Team am Institut für Pathologie möchte ich danken für die nette Aufnahme in ihre Mitte.

Vielen Dank an Herrn PD Dr. Sven Reese für die Hilfe bei der Statistik. Danke auch an Prof. Dr. Andrea Fischer für die Beleuchtung der klinischen Aspekte dieser Studie.

Meine lieben Mitdoktoranden aus dem Institut - Judith, Ulli, Almuth, Simone, Sonja, Eva und Simon: Schön, dass ich diese Zeit mit euch geteilt habe, wir waren wirklich ein super Team - ich habe selten so viel gelacht wie mit euch!

Danke Johannes für die Hilfe bei allen Computerfragen!

Vielen lieben Dank Amelie und Christiane, dafür das ihr immer viel Geduld und ein offenes Ohr für mich hattet und mich immer mit netten Worten aufzumuntern wusstet - so tolle Chefinnen wie euch muss man erst mal finden.

Liebe Kiwi, ich danke dir von Herzen für deine unerschütterliche, bedingungslose Freundschaft die sich als roter Faden vom Anfang bis zum Ende durch unseren Weg zum Tierarzt gezogen hat. Egal welche Höhen oder Tiefen, zusammen haben wir immer alles gemeistert. Schön, dass wir uns gefunden haben.

Mein größter und grenzenloser Dank gilt meinen Eltern. Dafür, dass ihr immer an mich glaubt und mich immer unterstützt, egal in welche Richtung mein Weg auch geht. Euer Vorbild und eure Liebe haben mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin und darauf bin ich sehr stolz!